

# **Expression von BK-Kanälen in humanen Gliomen unterschiedlicher Malignität**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Stefan Brodoehl**

geboren am 07. Dezember 1979 in Mühlhausen (Thüringen)

28. Juli 2005

Gutachter

1: .....

2: .....

3: .....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

# Verzeichnis der Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Erklärung</i>
A	Adenosin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
EGF	Endothelial Growth Factor
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GB	Glioblastom
H/E	Hämatoxylin/Eosin
HCL	Hierarchisches Clustern
IbTX	Iberiotoxin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KMC	K-Means Clustern
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCA	Principal Components Analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rcf	relative Zentrifugalkraft
(r)slo	BK-Kanal der Ratte
RT	Reverse-Transkriptase
SOM	Self Organising Maps
T	Thymin
TEA	Tetraethylammonium
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZL	Zelllinie
ZNS	Zentralnervensystem

## **Für meine Eltern**

So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig; man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat.  
(Johann Wolfgang von Goethe, 1787)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
2.1	Hirntumoren . . . . .	13
2.1.1	Primäre und sekundäre Hirntumoren . . . . .	13
2.1.2	Klassifikation und Pathologie von humanen Gliomen . . . . .	15
2.2	Ionenkanäle . . . . .	20
2.2.1	Kaliumkanäle . . . . .	20
2.2.2	Struktur und Charakteristika von BK-Kanälen . . . . .	23
2.3	Microarray-Experimente . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Auswahl und Verarbeitung der Gewebeproben . . . . .	29
4.1.1	Herkunft der Gewebeproben . . . . .	29
4.1.2	Probenverarbeitung und histologische Beurteilung . . . . .	29
4.2	Semi-quantitative RT-PCR . . . . .	33
4.2.1	Prinzip . . . . .	33
4.2.2	RNA-Gewinnung (Extraktion) . . . . .	34
4.2.3	cDNA-Synthese (Reverse Transkription) . . . . .	35
4.2.4	Äquilibration auf $\beta$ -Actin-Standard . . . . .	36
4.2.5	Primerdesign . . . . .	37
4.2.6	Isoform-spezifische PCR . . . . .	39
4.2.7	Auswertung . . . . .	41
4.3	Microarray-Experimente . . . . .	43
4.3.1	Der Human Genome U95 Av2 Array . . . . .	43

4.3.2	Analyse und Darstellung von Microarray-Daten . . . . .	43
4.3.3	Verfahren zur Normalisierung von Microarray-Daten . . . . .	44
4.3.4	Clusterverfahren . . . . .	47
4.3.5	Computergestützte Auswertung der Microarray-Daten . . . . .	52
4.4	Verwendete Materialien, Methoden und Geräte . . . . .	53
4.4.1	Materialien . . . . .	53
4.4.2	Geräte . . . . .	54
4.4.3	Software und Internet . . . . .	55
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
5.1	RT-PCR . . . . .	56
5.1.1	$\alpha$ -Untereinheit . . . . .	58
5.1.2	$\beta_1$ -Untereinheit . . . . .	59
5.1.3	$\beta_2$ -Untereinheit . . . . .	60
5.1.4	$\beta_3$ -Untereinheit . . . . .	61
5.1.5	$\beta_4$ -Untereinheit . . . . .	62
5.2	Analyse des BK-Kanals mit dem Microarray . . . . .	64
5.2.1	Hierarchical Clustering . . . . .	66
5.2.2	K-Means Clustering . . . . .	67
5.2.3	SOM – Self Organizing Map . . . . .	69
5.2.4	ANOVA . . . . .	72
5.2.5	PCA . . . . .	73
5.3	Zusammenfassender Vergleich RT-PCR – Microarray . . . . .	74
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
6.1	Expression von BK-Kanälen in normalem Hirngewebe . . . . .	77
6.2	Expression von BK-Kanälen in Gliomen . . . . .	78
6.3	Bedeutung von Ionenkanälen in Gliomen . . . . .	81
6.3.1	Modifizierte $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität . . . . .	82
6.3.2	Zellzyklus und Proliferation . . . . .	83
6.3.3	Migration und Invasion . . . . .	86
6.3.4	Zusammenfassung . . . . .	89
6.4	Molekulare und funktionelle Gliomdifferenzierung . . . . .	89
6.4.1	Klassifizierung von Gliomen – Auswahl molekularer Marker . . . . .	90
6.4.2	Ionenkanäle als molekulare Marker . . . . .	91

<b>7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen</b>	<b>95</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>96</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>108</b>
9.1 Danksagung . . . . .	108
9.2 Lebenslauf . . . . .	109
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	110

# Abbildungsverzeichnis

2.1	<i>Klinisch und genetisch definierte Progressionswege zum Glioblastom (Kleihues und Ohgaki 1999)</i>	18
2.2	<i>Membrantopologie der zwei verschiedenen Gruppen der Kaliumkanäle</i>	21
2.3	<i>Transmembransegmente spannungsgesteuerter Kaliumkanäle</i>	23
2.4	<i>Bauweisen spannungsgesteuerter 6TM-Kaliumkanäle</i>	24
2.5	<i>Struktur der <math>\alpha</math>-Untereinheit des BK-Kanals</i>	25
2.6	<i>Die <math>\beta</math>-Untereinheit und ihre Lokalisation in verschiedenen Geweben</i>	25
2.7	<i>Affymetrix GeneChip – Design der Probenpaare (probe pairs)</i>	27
2.8	<i>Untersuchung der Genexpression mit Affymetrix GeneChip</i>	27
4.1	<i>Kryoschnitt und HE-Färbung</i>	30
4.2	<i>Histologie des Probenmaterials</i>	31
4.3	<i>Schema der RT-PCR</i>	33
4.4	<i>Phasen der DNA-Amplifikation bei einer PCR</i>	34
4.5	<i>RNA-Isolation und Qualitätskontrolle</i>	36
4.6	<i>PCR mit <math>\beta</math>-Actin-Primern bei 24/28/32/36/40 Zyklen</i>	37
4.7	<i><math>\beta</math>-Actin-Äquilibrierung mit 30 PCR-Zyklen</i>	37
4.8	<i>Splicevarianten der <math>\alpha</math>-Untereinheit</i>	38
4.9	<i>Gelelektrophorese mit Primer-Dimeren</i>	39
4.10	<i>Gelelektrophorese der PCR aller BK-Primer bei verschiedenen Zyklen</i>	40
4.11	<i>Densitometrische Auswertung einer Gelelektrophorese</i>	41
4.12	<i>Normalisierung – Logarithmische Transformation</i>	45
4.13	<i>Normalisierung – Mittelwert- und Medianzentrierung</i>	46
4.14	<i>Normalisierung – Division durch Standardabweichung (SD)</i>	47
4.15	<i>Übersicht über Clusterverfahren</i>	48
4.16	<i>Hierarchisches Clustern mit einem agglomerativen Verfahren</i>	50

4.17	<i>Verschiedene agglomerative Verfahren zum hierarchischen Clustern</i>	50
4.18	<i>K-Means Clustern mit 2 Clustern</i>	51
4.19	<i>Self Organizing Map</i>	51
5.1	<i>Ergebnisse der PCR</i>	57
5.2	<i>Auswertung der Ergebnisse der <math>\alpha</math>-Untereinheit</i>	58
5.3	<i>Auswertung der Ergebnisse der <math>\beta_2</math>-Untereinheit</i>	60
5.4	<i>Auswertung der Ergebnisse der <math>\beta_4</math>-Untereinheit</i>	62
5.5	<i>Expression-Image von 201 Ionenkanälen auf Microarray</i>	64
5.6	<i>Splicevarianten der <math>\alpha</math>-Untereinheit auf Microarray HG_U95Av2</i>	65
5.7	<i>Isoformen der <math>\beta_1</math>-Untereinheit auf Microarray HG_U95Av2</i>	65
5.8	<i>Hierarchical Clustering (Gene und Experimente)</i>	67
5.9	<i>K-Means Clustering für 3 Experimente</i>	68
5.10	<i>K-Means Clustering für 4 Gengruppen</i>	68
5.11	<i>SOM mit 16 (<math>4 \times 4</math>) Clustern</i>	70
5.12	<i>Auswahl von Clustern des SOM(<math>4 \times 4</math>)</i>	71
5.13	<i>ANOVA der normalisierten Werte</i>	73
5.14	<i>Hauptkomponentenanalyse mit zweidimensionaler Darstellung</i>	74
6.1	<i>Diskriminierung mit Gensignatur aus Ionenkanälen</i>	91

# Tabellenverzeichnis

2.1	<i>WHO-Klassifikation der Hirntumoren (Kleihues et al. 2002)</i>	14
2.2	<i>Gliome und ihre WHO-Klassifikation (Kleihues et al. 2002)</i>	16
2.3	<i>KCN-Klassifikation der Kaliumkanäle (Gutman et al. 2003)</i>	22
4.1	<i>Ausgewählte Gewebeproben mit histologischem Befund</i>	32
4.2	<i>PCR-Bedingungen für <math>\beta</math>-Actin</i>	36
4.3	<i>Beispiel einer Expressionsmatrix</i>	44
4.4	<i>Chemikalien und Kits</i>	53
4.5	<i>Reaktionsmix für cDNA-Synthese und PCR</i>	53
4.6	<i>Primer</i>	54
4.7	<i>Geräte</i>	54
4.8	<i>Software und Internet</i>	55
5.1	<i>Signalwerte der Sequenzen für BK-Kanäle auf dem Microarray</i>	66
5.2	<i>Zusammenfassender Überblick der Untersuchungsergebnisse</i>	75

# 1 Zusammenfassung

Die funktionelle Bedeutung von spannungsabhängigen Ionenkanälen für Wachstum und Beweglichkeit von Tumorzellen ist seit längerem bekannt. Insbesondere die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierten spannungssensitiven Kaliumkanäle sind bei der Betrachtung humaner Gliome aufgefallen. Die vorliegende Arbeit zeigt anhand 5 verschiedener Normalgewebe, 8 Astrozytomen Grad II, 3 Astrozytomen Grad III, 10 primären Glioblastomen und 4 sekundären Glioblastomen, dass der BK-Kanal und seine Untereinheiten ein vom Malignitätsgrad abhängiges Expressionsmuster aufweisen. Mittels RT-PCR konnte eine Herunterregulation des Kanals bei Gliomen im Vergleich mit Normalgeweben und bei steigender Malignität der Gliome festgestellt werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Kanal-expression konnte für die  $\alpha$ -Untereinheit und die  $\beta_2/\beta_4$ -Untereinheiten gezeigt werden. Für die  $\beta_3$ -Untereinheit wurden keine PCR-Produkte erzielt – wahrscheinlich war die zu beobachtende mRNA-Menge zu gering. Aufgrund einer fehlenden Reproduzierbarkeit bei der Amplifikation der  $\beta_1$ -Untereinheit konnte die Tendenz einer Heraufregulierung in Gliomen, die in einigen Experimenten beobachtet wurde, nicht validiert werden.

Unter Verwendung eines *Microarrays* der Firma *Affymetrix*, mit dem die  $\alpha$ - und die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals untersucht wurden, ließen sich die Daten der RT-PCR für die  $\alpha$ -Untereinheit bestätigen. Weiterhin zeigte sich eine positive Korrelation der Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit mit dem Grad der Malignität – die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals könnte somit eine dominante Untereinheit in Gliomen darstellen.

Anhand der Daten des *Microarrays* konnten zusätzlich Veränderungen an einer *Vielzahl* von Ionenkanälen nachgewiesen werden, die eine Charakterisierung und Differenzierung niedergradiger und höhergradiger Gliome ermöglichten. In einem weiteren Ansatz konnte eine *minimale Anzahl von Genen* ermittelt werden, die eine Diskriminierung der Gewebe ermöglichte und somit als *molekulare Diskriminierungsmarker* in Frage kommen. Dies waren in unseren Gewebeserien die Gene *CLIC1*, *CLIC4*, *P2RX7*, *CHRM3* (Heraufregulierung in Gliomen), *ITPR1* und *KCNJ4* (Herunterregulierung in Gliomen); sie

diskriminieren Gliomentitäten und Malignitätsgrade.

Die deutliche Verminderung der Expression des BK-Kanals auf mRNA-Niveau lässt eine geringere Bedeutung des BK-Kanals in Gliomen vermuten, als zu Beginn der Untersuchung angenommen wurde. Einzig die  $\beta_1$ -Untereinheit zeigte in den Daten des *Microarrays* eine signifikante Expressionssteigerung in Gliomen. Diese Untereinheit könnte in Verbindung zur Malignisierung in Hirntumoren und resultierenden funktionellen Modifikation der membranalen und intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen stehen.



## 2 Einleitung

### 2.1 Hirntumoren

Gliome stellen die häufigsten primären Hirntumoren beim Menschen dar (Reifenberger und Collins 2004). Ihre Fähigkeiten zur Proliferation, zur Migration und Infiltration der umgebenden Gewebe, aber auch ihre schlechte Zugänglichkeit bei Therapie machen sie zu einem Forschungsgegenstand mit vielen Besonderheiten und Herausforderungen (Merzak und Pilkington 1997). In letzter Zeit konnten viele dieser Besonderheiten von Gliomen mit Ionenkanälen in Verbindung gebracht werden. Eine besondere Stellung nehmen dabei die Kaliumkanäle ein. Der *BK-Kanal* (*big conductance* Kaliumkanal) und seine Untereinheiten zählen zu den Kanälen, die bisher häufig in Gliomen beschrieben worden sind (Liu et al. 2002, Ransom und Sontheimer 2001, Weaver et al. 2004) – über deren Expression in Gliomen unterschiedlicher Malignität und ihre funktionelle Rolle bislang aber wenig bekannt ist.

#### 2.1.1 Primäre und sekundäre Hirntumoren

Unter dem Begriff *Hirntumor* werden alle innerhalb des Schädels liegenden Geschwülste des Zentralnervensystems zusammengefasst. Sie besitzen eine enorme histologische und zytologische Heterogenität und lassen sich in *primäre* und *sekundäre* Tumoren unterscheiden, wobei die Prävalenz beider Entitäten mit jeweils 50% angegeben wird (<http://www.oncologychannel.com/braincancer>).

**Primäre Hirntumoren** sind hirneigene Tumoren, d.h., sie sind aus neuroepithelialen und damit assoziierten Geweben entstanden.

**Sekundäre Hirntumoren** haben ihren Ursprung in Geweben außerhalb des zentralen Nervensystems und sind durch Metastasierung entstanden. Metastatische Tumoren sind per Definition bösartig.

Die WHO-Klassifikation differenziert mehr als 120 Subtypen, deren Bezeichnung abhängig vom Ursprung der entarteten Zellen ist. Tabelle 2.1 enthält eine Auswahl von Hirntumoren.

<b>WHO-Klassifikation der Hirntumoren</b>	
<i>Tumoren des neuroepithelialen Gewebes</i>	
astrozytäre Tumoren	benigne Tumoren
- Astrozytom	- Lipom
(fibrillär, protoplasmatisch, gemästetzig)	maligne Tumoren
- anaplastisches (malignes) Astrozytom	- Chondrosarkom
- Glioblastom	- Rhabdomyosarkom
(Riesenzellglioblastom, Gliosarkom)	- meningeale Sarkomatose
oligodendrogiale Tumoren	primär melanozytäre Läsionen
- Oligodendrogliom	- malignes Melanom
- anaplastisches (malignes) Oligodendrogliom	Tumoren ungeklärter Histogenese
- Mischgliome	
- Oligoastrozytom	<i>Lymphome und hämatopoetische Tumoren</i>
- anaplastisches (malignes) Oligoastrozytom	- maligne Lymphome
Ependymale Tumoren	- Plasmazytom
- Ependymom	
- anaplastisches (malignes) Ependymom	<i>Keimzelltumoren</i>
Plexus-chorioideus-Tumoren	- Germinom
Neuroepitheliale Tumoren ungeklärten	- embryonales Karzinom
Ursprungs	- Chorionkarzinom
- Gliomatosis cerebri	- Teratom (unreif, reif, mit maligner
Neuronale und gemischt neuronal-gliale	Transformation)
Tumoren	- gemischte Keimzelltumoren
- olfaktorisches Neuroblastom	
Tumoren des Pinealisparenchyms	<i>Zysten und tumorähnliche Läsionen</i>
Embryonale Tumoren	- Zyste der Rathkeschen Tasche
- Neuroblastom	- Epidermoidzyste
- Primitive neuroektodermale Tumoren (PNET)	- Dermoidzyste
- Medulloblastom	
<i>Tumoren der Hirn- und Rückenmarksnerven</i>	<b>Tumoren der Sellaregion</b>
- Schwannom (Neurilemmom, Neurinom)	- Hypophysenadenom
- Neurofibrom	- Hypophysenkarzinom
<i>Tumoren der Meningen</i>	- Kraniopharyngeom
Tumoren der meningoethelialen Zellen	<b>Lokale Ausbreitung regionaler Tumoren</b>
- Meningeom	- Chordom
- atypisches Meningeom	- Chondrom, Chondrosarkom
- papilläres Meningeom	- Karzinom
- anaplastisches (malignes) Meningeom	<b>Metastatische Tumoren</b>
Mesenchymale, nicht- meningoetheliale Tumoren	<b>Unklassifizierte Tumoren</b>

**Tabelle 2.1:** WHO-Klassifikation der Hirntumoren (Kleihues et al. 2002)

Tumoren des zentralen Nervensystems haben eine Inzidenz von 3,5–5,5 pro 100 000 Einwohnern (Schlegel 1999). Betrachtet man alle übrigen Tumorerkrankungen, entspricht das einer relativ geringen Inzidenz (Frauen 3,7% und Männer 2,7%).

Die *primären Hirntumoren* werden nach dem vorherrschenden Zelltyp und seinem Ursprungsgewebe eingeteilt. Bei den häufigen Entitäten erfolgt eine Einteilung nach WHO in vier Schweregrade von I bis IV, wobei es sich bei Typ IV um schnell wachsende, sehr maligne Tumoren handelt. Etwa 45 Prozent aller primären Hirntumoren sind *Gliome*, die von *Gliazellen* ausgehen (Schlegel 1999). Etwa die Hälfte dieser Tumoren der Glia entfällt auf den bösartigsten Typ, das *Glioblastom* (WHO Grad IV). Demgegenüber sind Tumoren der Hirnhäute (Meningeome), Tumoren der Hirnanhangdrüse (Hypophysenadenome), Tumoren, die von Hirnnerven (Neurinome) ausgehen, oder Lymphome des ZNS (primäre ZNS-Lymphome, PCNSL) seltener. Sehr selten bei Erwachsenen sind Medulloblastome (supratentoriell PNET genannt), Keimzelltumoren und einige andere Tumoren. Bei Kindern dominieren infratentorielle Medulloblastome, Astrozytome und Ependymome (Reifenberger und Collins 2004).

### 2.1.2 Klassifikation und Pathologie von humanen Gliomen

Die nachfolgenden Ausführungen über Differenzierungsgrade von Gliomen und die Beschreibung der Tumorentitäten stützen sich im Wesentlichen auf das Buch *Die Onkologie* (Hiddemann et al. 2004).

Gliome sind die häufigsten intrakraniellen Tumoren (90% aller neuroepithelialen Neoplasien) und leiten sich von Gliazellen und ihren Vorstufen ab. Gliome werden histologisch und nach ihrem Differenzierungsgrad (Grad I-IV) entsprechend der WHO-Klassifikation eingeteilt (Kleihues et al. 2002). Unter die Gliome werden Astrozytome (70% aller Gliome), Oligodendrogliome (7%) und Ependymome (3%) subsummiert (Tabelle 2.2).

Grad-I-Tumoren sind langsam wachsende, hoch differenzierte Tumoren. Sie werden als benigne angesehen und können, je nach Lokalisation und Zugänglichkeit, chirurgisch entfernt werden. Obwohl Grad-II-Tumoren histologisch als benigne eingestuft werden, können sie aufgrund ihres invasiven Wachstumsverhaltens chirurgisch nicht geheilt werden. Grad-III- und Grad-IV-Gliome gelten als hoch maligne, wobei Grad-IV-Tumoren die ungünstigste Prognose aufweisen.

### WHO-Klassifikation der Gliome

<i>Astrozytäre Tumoren</i>	
Pilozytisches Astrozytom	WHO-Grad I
Pleomorphes Xanthoastrozytom	WHO-Grad II
<i>Diffus wachsende Astrozytome</i>	
Fibrillär, protoplasmatisch, gemistozytisch	WHO-Grad II
Anaplastisches Astrozytom	WHO-Grad III
Glioblastoma multiforme	WHO-Grad IV
<i>Oligodendrogliale Tumoren</i>	
Oligodendrogliom	WHO-Grad II
Oligoastrozytom	WHO-Grad II
Anaplastisches Oligodendrogliom	WHO-Grad III
Anaplastisches Oligoastrozytom	WHO-Grad III
<i>Ependymale Tumoren</i>	
Myxopapilläres Ependymom	WHO-Grad I
Ependymom	WHO-Grad II
Anaplastisches Ependymom	WHO-Grad III

**Tabelle 2.2:** Gliome und ihre WHO-Klassifikation (Kleihues et al. 2002)

### Astrozytäre Tumoren

Die astrozytären Tumoren leiten sich von Astrozyten ab. Ein gutartiger Astrozytomtyp ist das *pilozytische Astrozytom*, das vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen zu finden ist. In die Gruppe der *diffus wachsenden Astrozytome* fallen das *fibrilläre*, *gemistozytische* und *protoplasmatische Astrozytom*. Unter diesen histologisch benignen Grad-II-Tumoren ist das *fibrilläre Astrozytom* der mit Abstand häufigste Vertreter. Als charakteristisch für diese Tumoren gelten niedrige Zelldichte sowie geringe Kern- und Zellatypien; Mitosen, Nekrosen und Gefäßproliferate fehlen. Häufig finden sich mikrozystische, Schleim enthaltende Areale. Die Proliferationsrate (Ki67-Index) liegt üblicherweise unter 4%. Der Subform des *gemistozytischen (gemästetzelligen) Astrozytoms* kommt insofern Bedeutung zu, als diese Gliome eine gesteigerte Tendenz zur Progression in einen höheren Tumorgrad aufweisen (Watanabe et al. 1997). Histologisches Hauptmerkmal ist eine hohe Anzahl (mindestens 20% der gesamten Tumorzellpopulation) so genannter gemistozytischer Astrozyten. Das *protoplasmatische Astrozytom* ist selten und weicht prognostisch nicht von den klassischen fibrillären Astrozytomen ab.

Im Gegensatz zu den niedriggradigen Astrozytomen zeichnet sich das *anaplastische Astrozytom* histologisch durch erhöhte Zellularität, deutliche Zellatypien und eine gesteigerte Mitoserate aus. Mit der gesteigerten Mitoserate geht auch ein gegenüber niedriggradigen Astrozytomen erhöhter Ki67-Proliferationsindex einher, welcher bei 5 – 10%

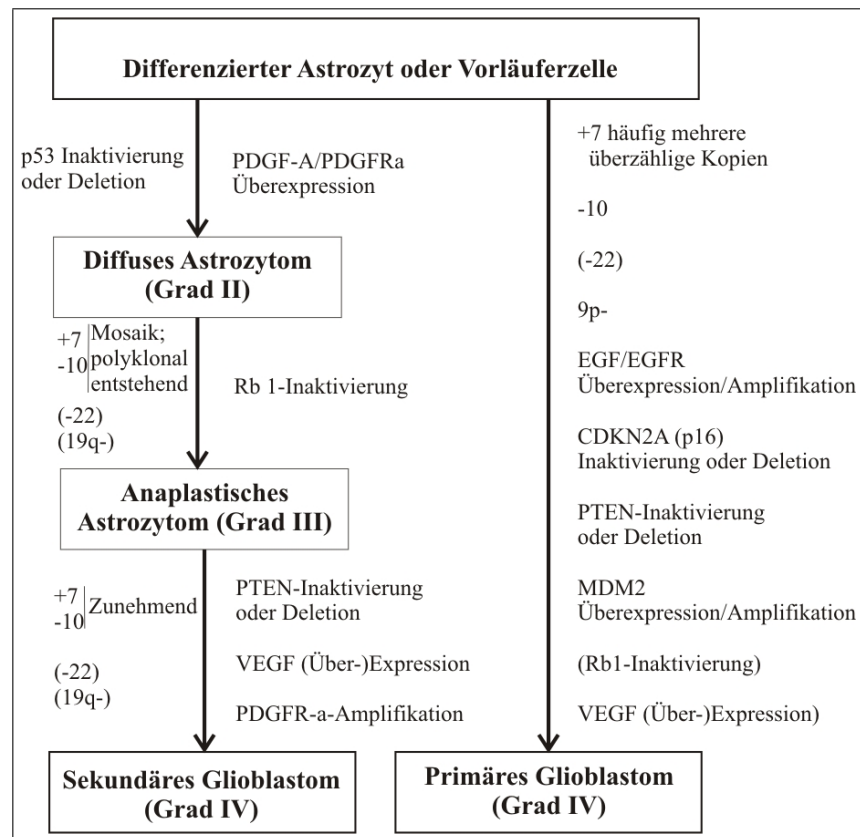
liegt. Erhöhte Mitose- und Proliferationsaktivität sind entscheidende Kriterien in der differentialdiagnostischen Abgrenzung zu niedriggradigen Astrozytomen (Grad II). Das Fehlen von glomerulären Gefäßproliferaten unterscheidet das anaplastische Astrozytom vom Glioblastoma multiforme (Grad IV) – allerdings neigen diese Gliome zur Entartung zum Grad IV (Reifenberger und Collins 2004).

### *Glioblastoma multiforme*

Das *Glioblastoma multiforme* (GBM) ist der häufigste Hirntumor im Erwachsenenalter und macht 50 – 60% aller Astrozytome aus. Betroffen sind in der Regel das mittlere und höhere Lebensalter. Mit einer mittleren Überlebenszeit des Erkrankten von nur wenigen Monaten gehört das Glioblastom zu den bösartigsten Tumoren überhaupt. Histopathologisch findet sich ein zellreicher, anaplastischer Tumor, der aus undifferenzierten, pleomorphen astrozytären Tumorzellen besteht. Charakteristisch ist ferner eine deutlich erhöhte mitotische Aktivität. Im Gegensatz zum anaplastischen Astrozytom sind glomeruloide Gefäßproliferate oder girlandenartig angeordnete Nekrosen die das Glioblastom definierenden Merkmale. Der Ki67-Proliferationsindex liegt gewöhnlich bei über 20%. Die Entstehung des Glioblastoms geschieht entweder *primär (de novo)* oder aber *sekundär*, d.h. aus vormalig höher differenzierten Astrozytomen. Es gibt Hinweise, wonach primäre und sekundäre GBMs unterschiedliche molekulargenetische Entstehungswege aufweisen (Abbildung 2.1). Nach dem jetzigen Kenntnisstand gibt es bei primären und sekundären Glioblastomen sowohl übereinstimmende genetische Veränderungen, wie Vermehrung der Kopienzahl von Chromosom 7, Verluste von Chromosom 10 bzw. homozygoter Aktivitätsverlust des PTEN-Gens, und solche, die sich gegenseitig weitestgehend ausschließen. Dazu gehören die p53-Inaktivierung und PDGFA/PDGFRa-Überexpression beim sekundären und die p16-Inaktivierung und EGFR- und/oder MDM2-Amplifikation beim primären Glioblastom. Histologisch und in ihrer Therapieresistenz unterscheiden sich diese Tumoren nicht. Während das primäre Glioblastom in der Regel innerhalb von weniger als einem Jahr zum Tode führt, ist beim sekundären Glioblastom die durchschnittliche Lebenserwartung geringfügig verlängert. Neuere Ergebnisse deuten daraufhin, dass die starke Angiogenese korreliert ist mit einer EGF/EGFR-induzierten VEGF-Überexpression (Kleihues und Ohgaki 1999).

### **Oligodendrogliale Tumoren**

Histologisch handelt es sich bei dem *Oligodendrogliom* vom WHO-Grad II um einen infiltrativ wachsenden, mäßig zellreichen Tumor. Hauptmerkmale sind Tumorzellen mit



**Abbildung 2.1:** *Klinisch und genetisch definierte Progressionswege zum Glioblastom (Kleihues und Ohgaki 1999)*

oft wasserklarem Zytoplasma, ein fein verzweigtes Netz pathologischer Kapillaren und Mikroverkalkungen. Im Gegensatz zu niedriggradigen Astrozytomen spricht das Vorhandensein von oftmals markanten Zellatypien und einzelnen Mitosen nicht gegen die Diagnose Oligodendrogliom Grad II. Der Ki67-Proliferationsindex ist niedrig, in aller Regel unter 5%. *Anaplastische Oligodendrogliome* werden den Grad-III-Tumoren zugeordnet. Malignitätskriterien, die sowohl fokal als auch diffus auftreten können, schließen hohe Zellularität, Zell- und Kernatypien, markante mitotische Aktivität und allenfalls Gefäßproliferate und Nekrosen mit ein.

## Mischgliome

Unter den Mischgliomen sind *Oligoastrozytome* die häufigsten Vertreter. Die Diagnose stützt sich dabei auf das gleichzeitige Vorhandensein einer astrozytären und oligodendroglialen Tumorkomponente. *Oligoastrozytome* können in zwei Formen auftreten. Entweder als *biphasischer* Typ (1), in dem sich die beiden Tumorkomponenten relativ

getrennt voneinander finden, oder aber als *diffuser* Typ (2), in dem die astrozytären und oligodendroglialen Komponenten durchmischt erscheinen. In der Diagnostik solcher Mischgliome kommt der Anwendung immunhistochemischer Zusatzuntersuchungen eine oftmals entscheidende Bedeutung zu, insbesondere dem sauren Gliafaserprotein, welches ein charakteristischer Bestandteil des Zytoskeletts von Astrozyten ist. Die Frage, wie ausgeprägt die einzelnen Tumorkomponenten für die Diagnose eines *Oligastrozytoms* sein müssen, ist nicht geklärt. In der Routinediagnostik wird in der Regel ein Anteil von rund 20% für die mindervertretene Zellkomponente gefordert. Anaplastische Veränderungen können in beiden Anteilen beobachtet werden. Diese umfassen erhöhte Zelldichte mit ausgeprägten Zell- und Kernatypien, erhöhte mitotische Aktivität, Gefäßproliferate und/oder Nekrosen. Fließende Übergänge in ein *sekundäres Glioblastoma multiforme* werden beobachtet. Das typische Ansprechen auf Chemotherapie nicht nur von *reinen* Oligodendrogliomen sondern auch von Oligoastrozytomen macht es erforderlich, dass in Tumorbiopsaten ein ubiquitär vorhandener oligodendroglialer Anteil sorgfältig gesucht werden muss (Tolnay 2002).

## Ependymale Tumoren

*Ependymome* treten zwar bevorzugt im Kindes- und Jugendalter auf, werden aber durchaus auch im Erwachsenenalter beobachtet. Es handelt sich dabei um meist recht gut abgrenzbare Tumoren, welche histologisch mäßig zellreich erscheinen und relativ monomorphe Zellen erkennen lassen. Schlüsselbefunde sind sogenannte ependymale Rosetten und perivaskulär angeordnete Pseudorosetten. Einzelne Mitosen und Nekroseherde stellen ebenfalls typische Merkmale *niedriggradiger Ependymome (WHO Grad II)* dar. Ferner finden sich oftmals regressive Veränderungen in Form myxoider Degeneration, tumoraler Einblutungen und Verkalkungen.

Unter den Subformen sei lediglich die Variante des *myxopapillären Ependymoms* erwähnt. Diese prognostisch sehr günstigen Tumoren werden nach WHO als Grad I eingestuft, treten meist im mittleren Erwachsenenalter auf und sind bevorzugt im Bereich des *Conus medullaris* und der *Cauda equina* lokalisiert. Das *myxopapilläre Ependymom* gilt als der häufigste intramedulläre Tumor. Ähnlich den übrigen angeführten Gliomen sind *anaplastische Ependymome* durch hohe Zellularität, mitotische Aktivität, Gefäßproliferation und ausgedehnte Nekroseherde charakterisiert (Tolnay 2002).

## 2.2 Ionenkanäle

Die Bewegung von Ladungsträgern ist einer der wichtigsten Aspekte der Zellphysiologie. Jede Bewegung von anorganischen Ionen, Phosphatgruppen oder geladenen Aminogruppen durch eine biologische Membran hat einen elektrischen Strom und somit eine Spannungsveränderung zur Konsequenz. *Ionenkanäle* als porenbildende Proteine sind integraler Bestandteil der Zellmembran aller lebenden Zellen und ermöglichen den Austausch von Ionen entsprechend eines elektrochemischen Gradienten. Sie besitzen eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen und verfügen über sehr komplexe Steuerungsmechanismen (Hille 1986).

Ionenkanäle können entsprechend ihrer Spezifität für verschiedene Kationen (z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ ) und Anionen (z.B.  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}^-$ ) sowie der Steuerung ihres Öffnungsverhaltens eingeteilt werden. Das Öffnen eines  $\text{Na}^+$ -spezifischen Kanals erlaubt  $\text{Na}^+$ -Ionen, aufgrund seines Gradienten in die Zelle zu fließen, was eine intrazelluläre Spannungspositivierung zur Folge hat. Im Gegenzug ermöglicht die Öffnung eines für  $\text{K}^+$  spezifischen Kanals den Fluss von  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle und somit eine Negativierung des Zellpotentials. Bedingt durch das kleine Volumen einer Zelle kann bereits eine relativ geringe Konzentrationsverschiebung von Ladungsträgern eine sehr schnelle Spannungsänderung an der Zellmembran bewirken – wie es für elektrische Signale notwendig ist. Die Steuerung des Öffnungsverhaltens von Ionenkanälen kann unter anderem durch Liganandenbindung, Spannungsänderung an der Zellmembran, mechanische Deformierung des Kanalproteins und Änderung des pH-Wertes erfolgen (Shepherd 1994, Silbernagl und Klink 1996).

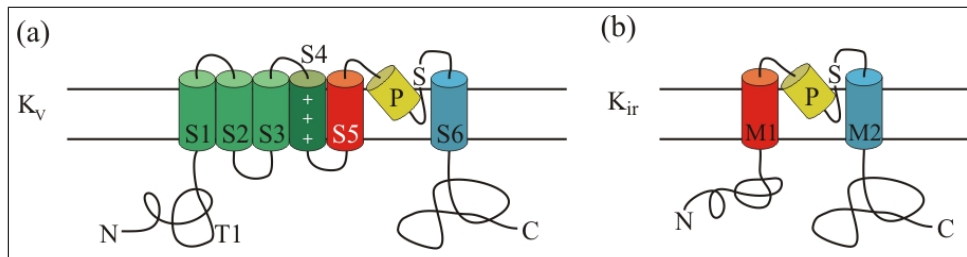
### 2.2.1 Kaliumkanäle

*Kaliumkanäle* (engl. *potassium channels*) wurden als die molekulare Struktur identifiziert, die für den Transport von  $\text{K}^+$ -Ionen durch die Zellmembran einer Nervenzelle während eines Aktionspotentials verantwortlich ist. Sie stellen den Prototyp eines spannungsgesteuerten Ionenkanals (*voltage-gated channel*) dar. Heute weiß man, dass die Kaliumkanäle die größte und die heterogenste Gruppe aller Ionenkanäle bilden (Hille et al. 1992). Es sind im menschlichen Genom mehr als 80 verschiedene Gene für Kaliumkanäle bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass bei vielen Erbkrankheiten des Menschen, wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Taubheit, Epilepsie oder Diabetes, Anomalien in Genen vorliegen, die für Kaliumkanäle codieren (Miller 2000).



## Einteilung der Kaliumkanäle

Es werden zwei große Gruppen von Kaliumkanälen unterschieden: (1) die *spannungsgesteuerten* Kaliumkanäle ( $K_v$ , *voltage-gated*), die 6 transmembranale Helices (6TM) in der Primärsequenz aufweisen und (2) die *einwärtsgleichrichtenden* Kaliumkanälen ( $K_{ir}$ , *inward-rectifier*), die eine 2TM Topologie besitzen (Miller 2000). Eine Gemeinsamkeit beider Gruppen sind zwei transmembranale Helices (rot und blau in Abbildung 2.2), die durch eine Pore (gelb in Abbildung 2.2) getrennt werden, weshalb sie auch als 6TM/1P bzw. 2TM/1P bezeichnet werden (Moczydlowski 1998).



**Abbildung 2.2:** Membrantopologie der zwei verschiedenen Gruppen der Kaliumkanäle Untereinheiten des Tetramers von (a)  $K_v$  mit transmembranalen Helices S1-S6 und (b)  $K_{ir}$  mit transmembranalen Helices M1 und M2; P – Pore; S – *signature sequenz*; N-Terminus und C-Terminus liegen intrazellulär; T1 – konservierte T1-Domäne, die mit einer zusätzlichen  $\beta$ -Untereinheit assoziiert sein kann (aus: Moczydlowski 1998, leicht geändert)

Ein System zur Erstellung einer umfassenden Nomenklatur für Kaliumkanäle, das phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen berücksichtigt, wurde von der *IUPHAR* (*International Union of Pharmacology*) vorgeschlagen. In dieser Einteilung werden die 6TM/1P Kanäle in zwei Gruppen gegliedert: spannungsgesteuerte ( $K_v$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte ( $K_{Ca}$ ) Kanäle. Ebenfalls als jeweils eigenständige Gruppe sind die 2TM/1P einwärtsgleichrichtenden Kanäle ( $K_{ir}$ ) und die Kanäle mit zwei Poren ( $K_{2P}$ ) berücksichtigt (Gutman et al. 2003).

An dieser Stelle sei noch das *KCN-System* zur Klassifizierung der Kaliumkanäle des *Human Gene Nomenclature Committee* (HGNC) erwähnt, das an einigen Stellen dieser Arbeit verwendet wurde. Leider lässt das KCN-System keine Rückschlüsse auf strukturelle oder phylogenetische Verwandtschaften der Kanalproteine zu, ist aber noch in vielen Arbeiten gebräuchlich (Gutman et al. 2003). Tabelle 2.3 zeigt einen Überblick über die KCN-Klassifikation.

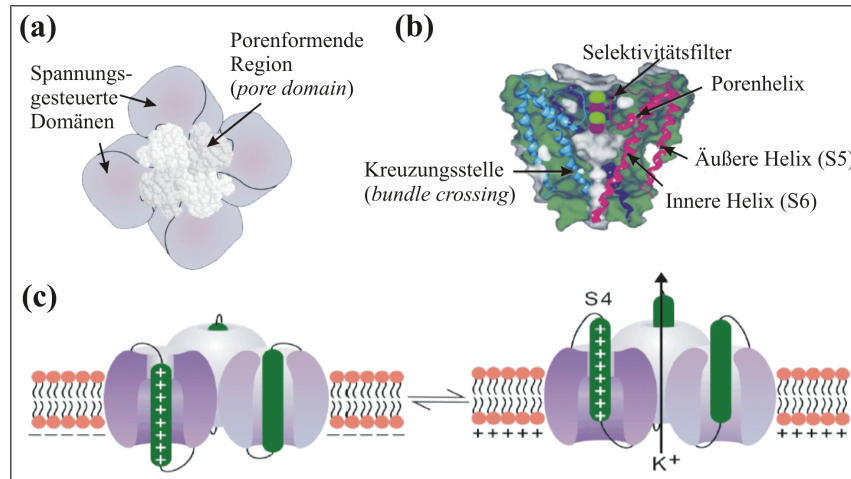
<i>Name</i>	<i>Protein</i>
KCNA1-KCNA7	6TM/1P $K_v$ Kanal (verwandt mit Shaker)
KCNB1, KCNB2	6TM/1P $K_v$ Kanal (verwandt mit Shab)
KCNC1-KCNC4	6TM/1P $K_v$ Kanal (verwandt mit Shaw)
KCND1-KCND3	6TM/1P $K_v$ Kanal (verwandt mit Shal)
KCNE1-KCNE3	1TM ISK zusätzliche Untereinheit
KCNF1	6TM/1P $K_v$ Kanal (regulierend)
KCNG1-KCNG2	6TM/1P $K_v$ Kanal (regulierend)
KCNH1-KCNH5	6TM/1P $K_v$ Kanal (EAG, ERG, ELK)
KCNJ1-KCNJ15	2TM/1P $K_{ir}$ Kanal
KCNK1-KCNK9	4TM/2P (TWIK, TASK, TREK)
KCNMA1	7TM/1P maxi- $K_{Ca}$ Kanal ( <i>BK-Kanal</i> )
KCNMB1	Untereinheit von KCNMA1
KCNN1-KCNN4	6TM/1P $SK_{Ca}$ und $IK_{Ca}$ Kanal
KCNQ1-KCNQ4	6TM/1P $K_v$ Kanal
KCNS1-KCNS3	6TM/1P $K_v$ Kanal (regulierend)

**Tabelle 2.3:** *KCN-Klassifikation der Kaliumkanäle (Gutman et al. 2003)*

### Charakteristika von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen

Ein typischer spannungsgesteuerter Kaliumkanal besteht aus *vier* ähnlichen oder identischen transmembranalen Einheiten (Yellen 2002). Jede Einheit besteht aus 6 transmembranalen Segmenten (*S1-S6*); zusammen bilden sie eine zentrale Pore (*6TM/1P*). N- und C-Termini der einzelnen transmembranalen Einheiten liegen intrazellulär. Die eigentliche Pore mit der Funktion eines spezifischen Filters für Kaliumionen wird durch die Segmente *S5* und *S6* geformt (Abbildung 2.3a-c). Die ersten vier transmembranalen Segmente (*S1-S4*) bilden einen Komplex, der das Öffnen und Schließen der Pore kontrolliert (*voltage sensor*). Besondere Bedeutung kommt dabei dem Segment *S4* zu, da es besonders viele positive Ladungen (an jeder dritten Stelle) in Form der Aminosäuren *Arginin* und *Lysin* trägt (Abbildung 2.3c). Dieses Segment wird in allen spannungsgesteuerten Ionenkanälen ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ) gefunden (*S4-Superfamilie*) und ist somit hochgradig konserviert (Miller 2000, Yellen 2002).

Für den weiteren Aufbau der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle existieren zwei verschiedene grundlegende Strukturen (Abbildung 2.4). Zum *einen* gibt es bei den  $K_{v1.x}$ - $K_{v4.x}$  Unterfamilien am N-Terminus eine *Tetramerisationsdomäne* (*T1*), die zur Verknüpfung der Untereinheiten untereinander, zur Verknüpfung mit einer zusätzlichen  $\beta$ -Untereinheit und für diverse Interaktionen mit anderen Proteinen dient (Gulbis et al. 2000). Eine *zweite* Gruppe von tetrameren *6TM* Kanälen, die nicht über eine *T1*-Domäne verfügt, ist durch das Vorhandensein einer *Sensordomäne* (*sensor domain*) am C-Terminus charakterisiert (Wallner et al. 1996).



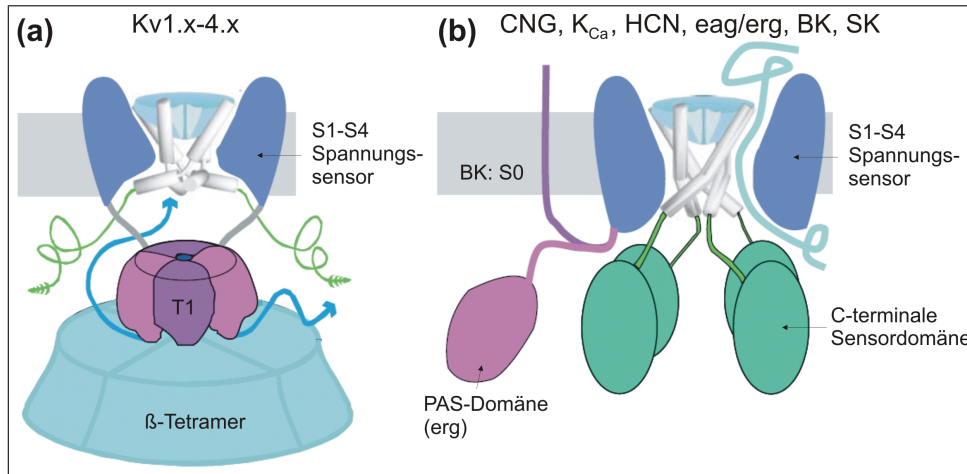
**Abbildung 2.3:** *Transmembransegmente spannungsgesteuerter Kaliumkanäle*

(a) Sicht auf die Struktur des Kanals von der extrazellulären Seite der Zellmembran (aus: Li-Smerin et al. 2000, leicht geändert); die zentrale *porenformende Region* (S5-P-S6) ist umgeben von den *spannungsgesteuerten Domänen* aus S1-S4; (b) porenbildende Region *S5-P-S6* (aus: Yellen 2002, leicht geändert); die innere Helix wird durch S5 und die äußere Helix durch S6 gebildet; die vier inneren Helices kreuzen und verengen den Kanal am unteren Teil (*bundle crossing*); (c) Funktionelle Darstellung (aus: Yang et al. 1996, leicht geändert) der Auswärtsbewegung des spannungssensitiven Transmembransegmentes S4, welche eine Öffnung des Kanals für Kalium ( $K^+$ ) zur Folge hat.

## 2.2.2 Struktur und Charakteristika von BK-Kanälen

BK-Kanäle sind Vertreter der *6TM* Kanäle. Sie besitzen vier distinkte  $\alpha$ -Untereinheiten (*KCNMA1* nach *KCN*-Klassifikation), die zusätzlich mit einer  $\beta$ -Untereinheit assoziiert sein können (Hanner et al. 1998). Die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals besteht aus 7 am N-Terminus gelegenen, transmembranalen  $\alpha$ -Helices (*S0-S6*) und 4 hydrophoben Domänen (*S7-S10*) am C-Terminus (Abbildung 2.5a). Der N-Terminus und der C-Terminus befinden sich intrazellulär. Zwischen *S5* und *S6* befindet sich die porenbildende Region, *S0* und *S8* sind für das spannungsabhängige *Gating* verantwortlich. *S9* besitzt zwei  $Ca^{2+}$ -sensitive Regionen (*Ca<sup>2+</sup>-Bowl*) sowie eine inhibitorische Domäne für das spannungsabhängige *Gating* (Garcia-Calvo et al. 1994, Knaus et al. 1994, Wanner et al. 1999).

Es wurde bisher nur ein einziges Gen gefunden, das die  $\alpha$ -Untereinheit kodiert: *slo* bei Drosophila, *mslo* bei der Maus und *hslo/KCNMA1* beim Menschen (Atkinson et al. 1991). Das Gen *hslo* befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 10 (Bande q22.3). Bei diesem Gen wurde umfangreiches alternatives *Splicing* beobachtet (Abbildung 2.5b). Die verschiedenen Isoformen (*KCNMA1.1..n*) besitzen spezifische Vertei-

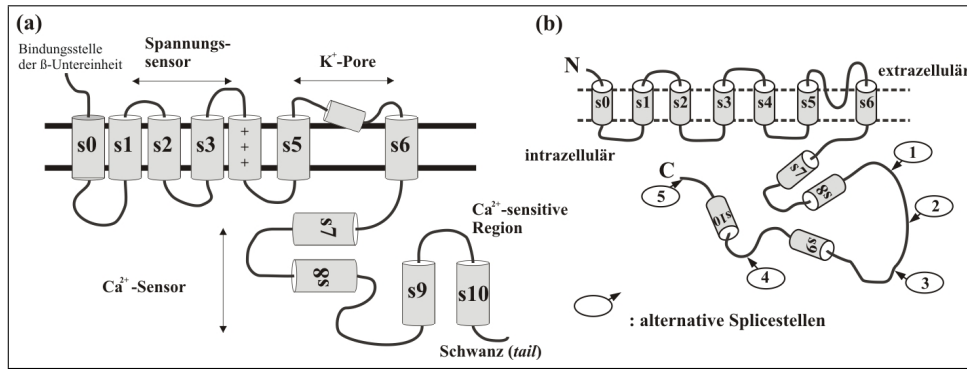


**Abbildung 2.4:** Bauweisen spannungsgesteuerter 6TM-Kaliumkanäle

(a) T1-Domäne am N-Terminus in Assoziation mit einem  $\beta$ -Tetramer; (b) C-terminale Sensordomäne, Vertreter dieser Gruppe sind die spannungsgesteuerten *KCNQ*- und *EAG/ERG*-Kanäle sowie Kanäle, die durch Spannungsänderung und Ligandenbindung (*BK*-Kanäle, *HCN*-Kanäle) oder ausschließlich durch intrazelluläre Ligandenbindung (*SK*-Kanäle, *CNG*-Kanäle) gesteuert werden; *BK*-Kanäle besitzen am N-Terminus eine zusätzliche transmembranale *S0*-Domäne während sich dort bei *ERG*-Kanälen eine *PAS* (*PYP-like sensor*)-Domäne befindet (aus: Yellen 2002, leicht geändert).

lungsmuster in neuronalen und nicht-neuronalen Geweben und weisen im Bezug auf  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^{+}$ -Ströme teilweise sehr unterschiedliche electrophysiologische Eigenschaften auf (Tseng-Crank et al. 1994). Nachgewiesen wurde die  $\alpha$ -Untereinheit des *BK*-Kanals bisher in den verschiedensten Geweben, wie beispielsweise der glatten Muskulatur, Nierentubuli und Neuronen des ZNS (DeCoursey et al. 1996, Ferrer et al. 1996, Snetkov et al. 1996, Tanaka et al. 1997, Behrens et al. 2000, Weiger et al. 2000).

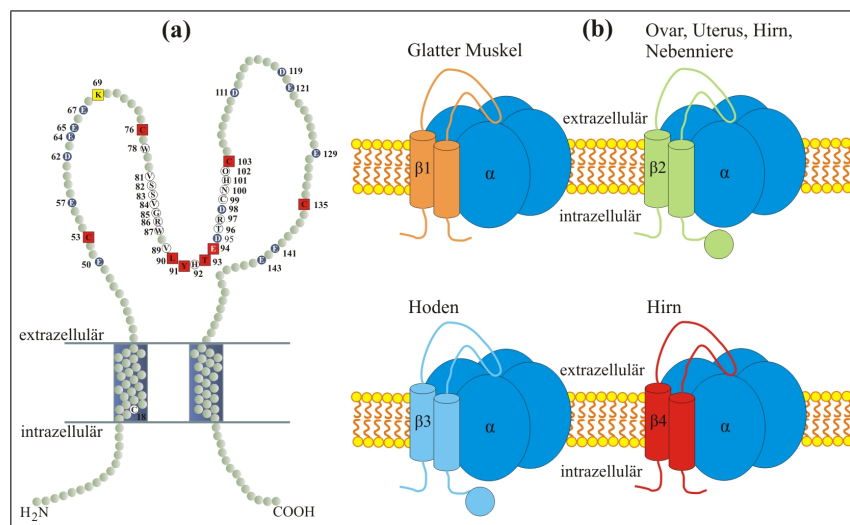
Die akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten des *BK*-Kanals (Abbildung 2.6a) bestehen aus zwei transmembranalen Domänen, einem extrazellulären *Loop* und intrazellulär liegenden N- und C-Termini. Enorme Bedeutung kommt der  $\beta$ -Untereinheit durch die Modulierung der Eigenschaften des *BK*-Kanals zu. Es konnte gezeigt werden (Hanner et al. 1998), dass eine Coexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des *BK*-Kanals zu einer starken Erhöhung der Affinität des Kanals zu dem spezifischen Blocker Charybdotoxin ( $^{125}\text{I}$ -ChTX) führt. Bedeutende Einflüsse der  $\beta$ -Untereinheit konnten ebenfalls bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität, der Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik und der Blockierbarkeit durch weitere spezifische Blocker (z.B. Iberitoxin) nachgewiesen werden (Ransom und Sontheimer 2001). Während die vier verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten des *BK*-Kanals eine gewebeabhängi-



**Abbildung 2.5:** Struktur der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals

(a) Wichtige Strukturmerkmale der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals (Homepage Prof. T. Jacob, <<http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/jacob>>, leicht geändert); (b) Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals mit 5 identifizierten alternativen Splicestellen; die transmembranalen  $\alpha$ -Helices  $S0$ - $S6$  und die C-terminalen hydrophoben Domänen  $S7$ - $S10$  sind in grauen Zylindern dargestellt (aus: Liu et al. 2002, leicht geändert).

ge Expression aufweisen (Abbildung 2.6b), ist ihre Expression in Gliomen noch kaum untersucht.



**Abbildung 2.6:** Die  $\beta$ -Untereinheit und ihre Lokalisation in verschiedenen Geweben

(a)  $\beta_1$ -Untereinheit mit zwei transmembranalen Domänen, einem extrazellulären Loop und intrazellulär liegenden N- und C-Termini (aus: Hanner et al. 1998, leicht geändert); (b) Lokalisation der 4 verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$  – orange,  $\beta_2$  – grün,  $\beta_3$  – hellblau und  $\beta_4$  – rot) zusammen mit dem zugehörigen Tetramer (blau) der  $\alpha$ -Untereinheit (Homepage Prof. Brenner, <<http://physiology.uthscsa.edu/faculty/brenner.html>>, leicht geändert).

## 2.3 Microarray-Experimente

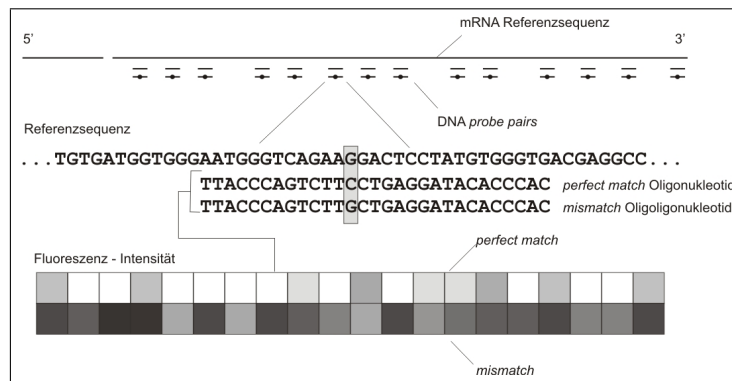
*Microarray*-Experimente ermöglichen die Untersuchung von Genen in neuen Dimensionen. Statt sich auf nur einige wenige Gene zu beschränken, kann mit Hilfe dieser Technologie eine sehr große Anzahl von Genen gleichzeitig untersucht werden. Die enormen Datenmengen können für die Beantwortung einer Vielzahl unterschiedlichster Fragestellungen verwendet werden.

*Microarrays* sind speziell beschichtete mikroskopische Platten (*Slides*). Diese enthalten maschinell in sortierten Reihen (*spots*) aufgetragene Proben (DNA, RNA, Protein, Gewebe). Abhängig vom Probenmaterial gibt es verschiedene Arten von *Microarrays*: (1) *DNA-Microarray*, (2) *RNA-Microarray*, (3) *Protein-Microarray* und (4) *Gewebe-Microarray* (Sturn et al. 2002).

Für *cDNA-Microarrays* werden meist PCR-amplifizierte cDNA-Fragmente in einer Länge von 0,6 – 2,4kb verwendet. Aufgrund dieser relativ langen Fragmente sind sie spezifisch und ergeben starke Signale. Die Verwendung von *Arrays* mit synthetischen Oligonukleotiden stellt eine attraktive Alternative gegenüber der Verwendung von *cDNA-Microarrays* dar. *Lange Oligonukleotide* (50-120 Nukleotide) liefern zuverlässige Hybridisierungssignale und sind ausreichend spezifisch. Im Gegensatz zu *cDNA-Microarrays* entfällt die notwendige Auswahl, Anzucht und DNA-Isolation aus cDNA-Klonen (Homepage Affymetrix <<http://www.affymetrix.com>>).

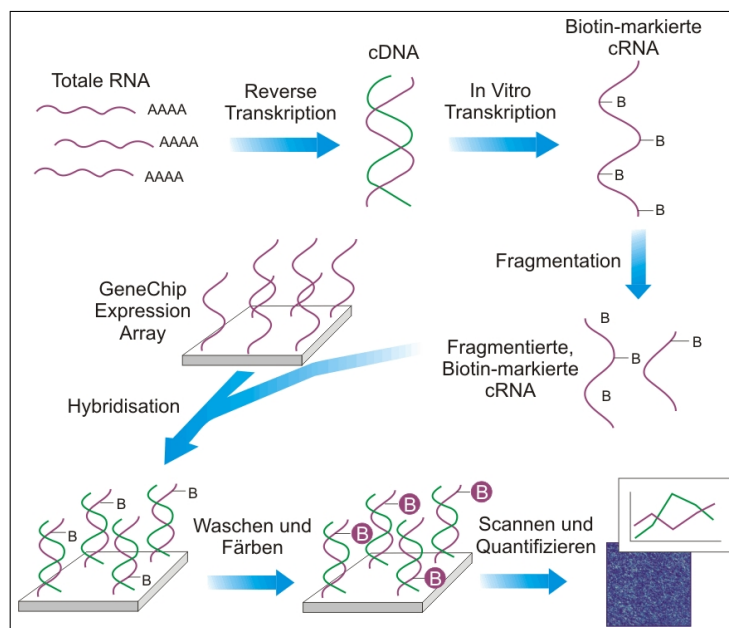
### Affymetrix GeneChip

Bei dem *GeneChip Array* von *Affymetrix* kommt es zum Einsatz von *kurzen Oligonukleotiden* (12-25 Nukleotide). Um der Gefahr einer Fehlhybridisierung entgegenzuwirken, werden für jedes Gen ungefähr 11-20 spezifische Oligonukleotide synthetisiert, die zusätzlich durch ein so genanntes *mismatch*-Oligonukleotid (Basenaustausch) ergänzt werden (Abbildung 2.7). Die Synthese der Oligonukleotide erfolgt direkt auf dem Trägermaterial. Die Abbildung 2.8 gibt einen Überblick über die Funktionsweise eines *Affymetrix GeneChip*. Die *Microarrays* von *Affymetrix* ermöglichen ein spezifisches Erkennen von Gentranskripten und ihren Splicevarianten sowie Unterschieden eng verwandter Mitglieder innerhalb einer Genfamilie. Da auf jedem *Affymetrix GeneChip* Referenz- und Kontrollproben enthalten sind, können die Daten verschiedener Experimente normalisiert werden und sind somit untereinander vergleichbar.



**Abbildung 2.7:** *Affymetrix GeneChip – Design der Probenpaare (probe pairs)*

Auf jedem Chip können 5.000-20.000 Probenpaare eingesetzt werden. Die Anwesenheit einer spezifischen mRNA wird durch eine Reihe (11-20) Probenpaare untersucht. Die jeweiligen Probenpaare unterscheiden sich in nur einem Nukleotid: *perfect match* ist komplementär zur Zielsequenz während bei der *mismatch*-Probe ein einzelner Basenaustausch erfolgt. Die Hybridisation der fluoreszierenden mRNA mit diesen Probenpaaren auf dem GeneChip wird durch Laserscanner gemessen (Abbildung von Affymetrix-Homepage <<http://www.affymetrix.com>>, leicht modifiziert).



**Abbildung 2.8:** *Untersuchung der Genexpression mit Affymetrix GeneChip*

Zunächst wird aus der totalen RNA unter Verwendung von Reverse-Transkriptase doppelsträngige cDNA synthetisiert. Die cDNA wird anschließend als Template für eine *In Vitro Transkription* (IVT) verwendet, bei der Biotin-markierte *antisense*-RNA entsteht (cRNA). Um die Effektivität und Reproduzierbarkeit der Hybridisation zu erhöhen, wird die cRNA unter Einwirkung von Hitze und  $Mg^{2+}$  fragmentiert (25–200b). Nach der Hybridisation wird der Chip gefärbt und mit einem Laser gescannt (Abbildung von Affymetrix-Homepage <<http://www.affymetrix.com>>, leicht modifiziert).

### 3 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit soll durch molekularbiologische Methoden die mRNA der porenbildenden  $\alpha$ -Untereinheit, der vier zusätzlichen  $\beta$ -Untereinheiten sowie eine gliomspezifische Variante (gBK) von BK-Kanälen in humanen Gliomen unterschiedlicher Histologie und Malignität nachweisen und quantifizieren.

Die Expression aller Untereinheiten sollte zwischen Normalgeweben und Gliomen sowie zwischen niedergradigen und hochgradigen Gliomen verglichen werden, um eventuell vorhandene charakteristische Unterschiede zwischen den Gruppen zu entdecken. Durch die zusätzliche Verwendung eines DNA-*Microarrays*, welches die Gene von 201 Ionenkanälen bzw. Rezeptoren für Ionen beinhaltete (darunter drei für die  $\alpha$ -Untereinheit und einen für die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals), sollte versucht werden, signifikante Unterschiede zwischen den Gewebepopulationen aufzuweisen und molekulare Diskriminierungsmarker zu isolieren.

Die gewonnenen Ergebnisse sollten abschließend mit Daten der Literatur verglichen werden, um Hypothesen über die Bedeutung von BK-Kanälen in Gliomen und die Möglichkeiten zur molekularen und funktionellen Charakterisierung von Gliomen abzuleiten.



## **4 Materialien und Methoden**

### **4.1 Auswahl und Verarbeitung der Gewebeproben**

#### **4.1.1 Herkunft der Gewebeproben**

Die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Gewebeproben (Tumorgewebe und Normalgewebe) stammen von Patienten, die an der Klinik für Neurochirurgie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und am Zentralklinikum Bad Berka operiert wurden.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena geprüft und freigegeben.

Die untersuchten Gewebetypen sind niedergradige und höhergradige Astrozytome sowie Normalgewebe. Des Weiteren wurde die Zelllinie 1321N1, die einem humanen astrozytären Gliom entspricht (Pallotta et al. 1987), verwendet. Als Normalgewebe wurde Gewebe verwendet, welches von einer ausgedehnten Tumorresektion stammte, weit vom Tumor entfernt lag und weder tumoröse Veränderungen noch reaktive Gliose zeigte. Die Proben (Tumorgewebe und Normalgewebe) wurden nach der Entnahme bis zur weiteren Aufarbeitung in der Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität tiefgefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

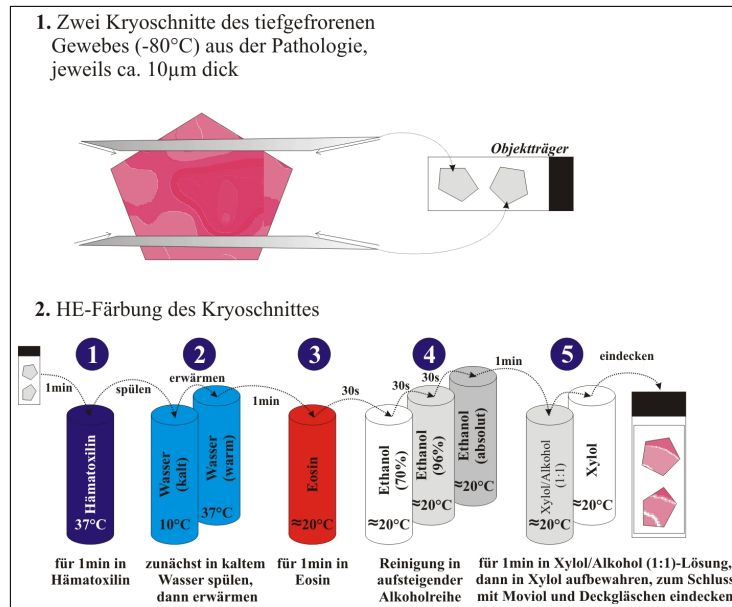
Verwendet wurden 5 Normalgewebe, 8 Astrozytome WHO Grad II, 3 Astrozytome WHO Grad III, 10 primäre Glioblastome, 4 sekundäre Glioblastome sowie eine Zellsuspension der Zelllinie 1321N1 (siehe Tabelle 4.1).

#### **4.1.2 Probenverarbeitung und histologische Beurteilung**

Bei einer Tumorresektion wird die betroffene Geweberegion großräumig entfernt. Das entnommene Gewebe enthält somit Tumor und umliegendes Gewebe. Für die Untersuchung wurde nur reines Tumorgewebe verwendet.

Zunächst wurden aus den tiefgefrorenen Gewebeproben innerhalb des Kryostaten per

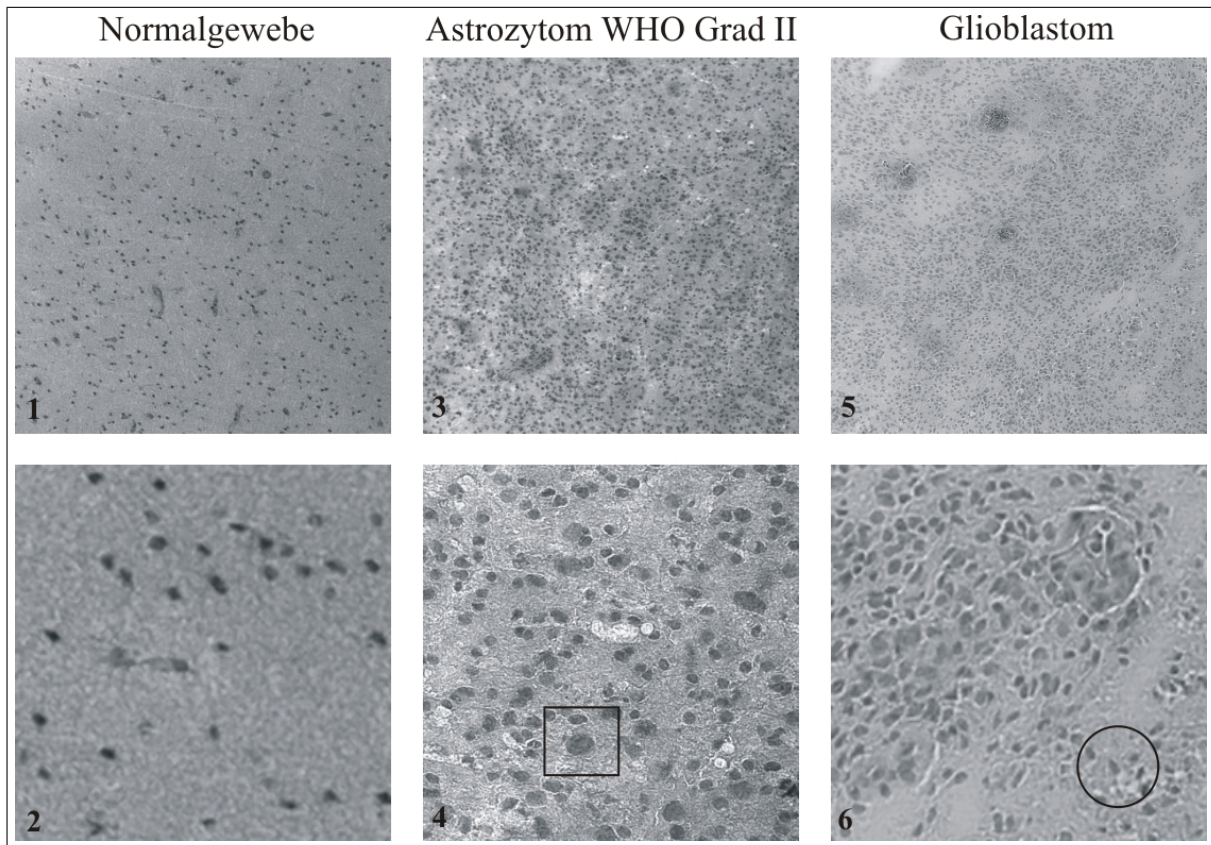
Hand bei halbgeöffneter Verschlussplatte 3-10 kleinere Brocken mit einem Gewicht von jeweils ungefähr 200mg herausgebrochen. Anschließend wurde ein 10 $\mu$ m starker Schnitt von der Ober- und Unterseite des jeweiligen Brockens bei  $-21^{\circ}\text{C}$  im Kryostaten hergestellt, der auf einen Objektträger gezogen wurde (Abbildung 4.1). Der Rest jedes ge-



**Abbildung 4.1:** *Kryoschnitt und HE-Färbung*

Schema für die Herstellung eines Kryoschnittes und dessen HE-Färbung zur Beurteilung auf Tauglichkeit für die RNA-Isolierung.

schnittenen Brockens (50-100mg) wurde separat verpackt und wieder auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gelegt. Während der gesamten Prozedur des Zerbrechens und des Kryoschneidens wurde ein Auftauen vermieden. Als nächstes wurde der Schnitt auf dem Objektträger nach einem standardisierten Protokoll HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt. Durch die HE-Färbung werden Kerne blau und cytoplasmatische Bestandteile rot gefärbt (Abbildung 4.2). Nachdem für jede Gewebeprobe auf diese Weise ungefähr 3-10 Brocken verpackt und für jeden Brocken Schnitte angefertigt worden waren, wurden alle Kryoschnitte Professor Stephan Patt (Neuropathologie Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Tumor-Klassifikation und Beurteilung auf Tauglichkeit (der Gewebeschnitt enthält nur Normalgewebe oder nur Tumorgewebe) für die weitere Untersuchung vorgelegt. Dadurch kam es zur endgültigen Auswahl der in der Arbeit verwendeten Gewebeproben. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über die Gewebeproben und ihre detaillierte histologische Beurteilung nach der Aufarbeitung.



**Abbildung 4.2:** *Histologie des Probenmaterials*

Kryoschnitte, HE-gefärbt; 1 – Normalgewebe (Mark) in Übersicht ohne Auffälligkeiten; 2 – vergrößerter Abschnitt aus 1; 3 – Astrozytom WHO Grad II mit relativ verstreut liegenden Tumorzellen (siehe Viereck in Abbildung 4); 4 – vergrößerter Abschnitt aus 3 mit einigen charakteristischen großleibigen Zellen; 5 – Glioblastom mit großer Anzahl polymorpher Zellen und einigen Nekrosen; 6 – vergrößerter Abschnitt aus 5 zeigt polymorphe Zellen in bereits nekrotischer Umgebung (siehe Kreis); 40fache Vergrößerung in den Abbildungen 1,3 und 5; 250fache Vergrößerung in den Abbildungen 2,4 und 6.

Bez.	Histologischer Befund	Geschlecht/Alter	Anmerkung
<i>Gruppe N – Diagnose: Normalgewebe</i>			
N 1	Hirnrinde, von Tumoroperation AIII 3	M/40	
N 2	von Tumoroperation AII 2	W/29	
N 3	von Tumoroperation AII 5	W/33	HG-U95Av2 <sup>N1</sup>
N 4	von Tumoroperation AII 6	M/52	HG-U95Av2 <sup>N2</sup>
N 5	Normalgewebe einer anderen Gliomoperation	M/40	
N*	von Tumoroperation AII 8	M/31	HG-U95Av2 <sup>N3</sup>
<i>Gruppe AII – Diagnose Astrozytom Grad II</i>			
AII 1	komplett Tumor	M/33	
AII 2	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	W/29	
AII 3	komplett Tumor	W/23	
AII 4	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	W/34	HG-U95Av2 <sup>A1</sup>
AII 5	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	W/33	HG-U95Av2 <sup>A2</sup>
AII 6	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/52	
AII 7	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/18	HG-U95Av2 <sup>A3</sup>
AII 8	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/31	HG-U95Av2 <sup>A4</sup>
<i>Gruppe AIII – Diagnose: Astrozytom Grad III</i>			
AIII 1	komplett Tumor	M/13	
AIII 2	komplett Tumor, keine Gefäße	M/48	
AIII 3	nekrotischer Tumor, Kernkonturen schlecht zu sehen	M/40	
<i>Gruppe ZL – Diagnose: humanes astrozytäres Gliom (Zelllinie 1321N1)</i>			
ZL 1	– keine zytologische Beurteilung erfolgt –	kA/kA	
<i>Gruppe GB – Diagnose: primäres Glioblastom</i>			
GB 1	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/56	
GB 2	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	W/79	HG-U95Av2 <sup>G1</sup>
GB 3	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/50	HG-U95Av2 <sup>G2</sup>
GB 4	komplett Tumor, vitales Gewebe, kaum Nekrosen	M/79	
GB 5	komplett Tumor	W/48	HG-U95Av2 <sup>G3</sup>
GB 6	komplett Tumor	W/68	HG-U95Av2 <sup>G4</sup>
GB 7	komplett Tumor	M/76	HG-U95Av2 <sup>G5</sup>
GB 8	komplett Tumor, aber Nekrosen	W/64	
GB 9	komplett Tumor, Nekrosen, wenig vitales Gewebe	M/67	
GB 10	überwiegend Tumor (mehr als 80%)	M/44	
<i>Gruppe SG – Diagnose: sekundäre Glioblastome</i>			
SG 1	GB mit Anteil oligodendrogialer Differenzierung	W/54	
SG 2	komplett Tumor, Rezidiv eines OIII mit kleinherdigem Übergang in GB	M/49	
SG 3	GB aus AIII, komplett Tumor	M/76	
SG 4	GB aus AII/AIII, komplett Tumor, viel vitales Gewebe	M/44	

**Tabelle 4.1:** Ausgewählte Gewebeproben mit histologischem Befund

HG-U95Av2\*\* – Probe für Untersuchung mit *Microarray HG-U95Av2* verwendet, \*\* bezeichnet das Kürzel der Gewebeprobe auf dem *Microarray*; die Gewebeprobe N\* wurde nur für die Analyse mit dem *Microarray HG-U95Av2* verwendet; Bez. – Bezeichnung, kA – keine Angaben möglich.

## 4.2 Semi-quantitative RT-PCR

### 4.2.1 Prinzip

Bei der RT-PCR wird ausgehend von einer Gewebeprobe zunächst RNA gewonnen (Extraktion), die mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* in DNA umgeschrieben wird (*Reverse Transcription*). Diese DNA oder bestimmte Abschnitte der DNA werden anschließend in einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert (Abbildung 4.3).

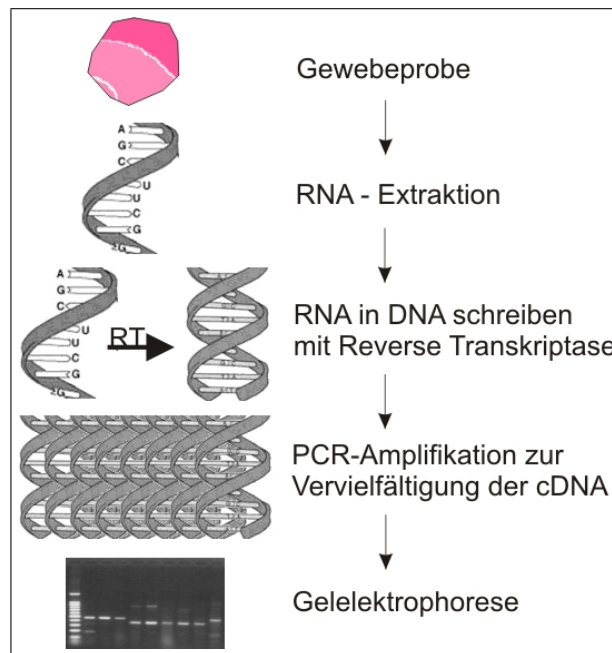
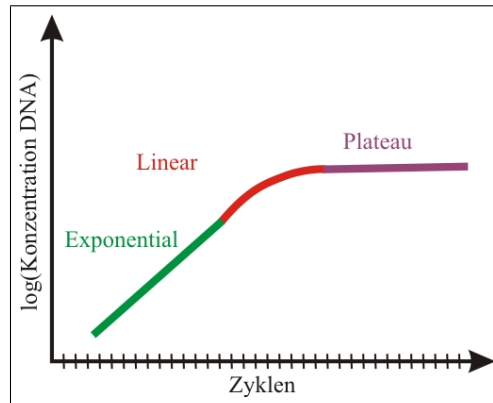


Abbildung 4.3: Schema der RT-PCR

Um eine quantitative Beurteilung zu gewährleisten, sollte die Amplifikation ausschließlich in der *exponentiellen* Phase stattfinden – nur in dieser Phase führt jeder Amplifikationszyklus zu einer Verdopplung des PCR-Produktes (Abbildung 4.4). Zum Schluss kann das PCR-Produkt durch Gelelektrophorese dargestellt werden. Bei einer semi-quantitativen PCR werden die Intensitäten (Leuchtkraft des PCR-Produktes auf dem Elektrophoresegele) der PCR-Produkte auf dem Elektrophoresegele untereinander verglichen. Dadurch kann eine Aussage über die Menge des hergestellten PCR-Produktes getroffen werden (Ferre 1992, Hayward et al. 1998).



**Abbildung 4.4:** *Phasen der DNA-Amplifikation bei einer PCR*

Zu Beginn kommt es in jeder Phase zu einer Verdopplung des PCR-Produktes (Exponential). Bei fortschreitendem Verbrauch der Reagenzien und beginnender DNA-Denaturierung beginnt die Amplifikation zu stagnieren (Linear), bis kein Produkt mehr entsteht (Plateau).

## 4.2.2 RNA-Gewinnung (Extraktion)

### RNA-Isolierung

Für die Isolierung totaler RNA aus tiefgefrorenem Gewebe kam das *RNeasy Mini Kit* der Firma *QIAGEN* zum Einsatz. Basierend auf *RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues* der Firma *QIAGEN* wurde die Extraktion durchgeführt. Abschnitt 4.4.1 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen.

Für jede RNA-Isolierung wurde in den frisch gereinigten Homogenisator zuerst 1,8ml *Buffer RLT* und 18µl  $\beta$ -Mercaptoethanol gegeben (*QIAGEN* empfiehlt 600µl für 20-30mg). Anschließend wurde jede tiefgefrorene Gewebeprobe mit einem Gewicht zwischen 40mg bis 80mg in tiefgefrorenem Zustand in den Homogenisator gegeben und dort mit dem Pistill vollständig homogenisiert (Abbildung 4.5a). Von diesem Homogenisat wurden 1,3ml weiterverwendet, der Rest wurde als Homogenisat wieder eingefroren. Von den 1,3ml Homogenisat wurden 2mal 650µl auf den *QIAShredder* (aus *RNeasy-KIT*) geladen und 2min bei 16,1rcf (relative Zentrifugalkraft) zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde (ohne eventuell entstandenes Pellet) erneut auf den *QIAShredder* geladen und 2min zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Durchfluss aus dem Auffanggefäß des *QIASchredders* in ein neues 1,5ml Gefäß umgefüllt und wieder 3min bei 16,1rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Gefäß überführt, das alte (inklusive Pellet am Boden) verworfen. Der Inhalt des neuen Gefäßes wurde anschließend mit je 650µl auf zwei neue Gefäße verteilt, auf die jeweils 650µl 70%iger Ethanol durch

ständiges Auf- und Abpipettieren gegeben wurde. Die resultierenden 4 Behälter mit je 1,3ml Lösung wurden nacheinander auf die *RNeasy Mini Column* geladen und je 15s bei 16,1rcf zentrifugiert, wobei jedes Mal der Durchfluss verworfen wurde. Anschließend wurden 700 $\mu$ l *Buffer RW1* auf dieselbe Säule geladen und 15s bei 16,1rcf zentrifugiert, worauf der Durchfluss und das 2ml Auffanggefäß verworfen und die Säule in einem neuen 2ml Auffanggefäß (aus *RNeasy-KIT*) platziert wurde. Daraufhin wurde die Säule mit 500 $\mu$ l *RPE* beladen und 15s bei 16,1rcf zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und der letzte Schritt (*RPE*) einmal wiederholt, worauf abermals der Durchfluss verworfen wurde. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5ml Gefäß gestellt und 1min bei 16,1rcf zentrifugiert, um jegliche Flüssigkeit aus der Säule zu entfernen. Zum Schluss wurde die Säule in ein neues 1,5ml Gefäß (aus *RNeasy-KIT*) überführt, mit 40 $\mu$ l RNase freiem  $H_2O$  beladen, 1min stehen gelassen und dann 1min bei 16,1rcf zentrifugiert. Die Säule wurde dann verworfen und das Gefäß, das gereinigte RNA enthielt, zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA

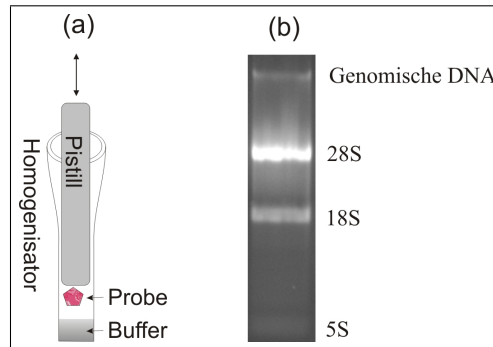
Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte durch ein UV-Spektrometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 260nm. Dafür wurde eine Verdünnung 1:25 der gereinigten RNA angefertigt. Eingestellt wurde das Gerät auf eine Probenverdünnung von 1:25 und eine Wellenlänge von 260nm. Als Referenzprobe (Probe ohne nachweisbare RNA) wurde das Wasser verwendet, welches bereits für die RNA-Verdünnung benutzt wurde. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde die OD (optische Dichte) bei 280nm und 260nm gemessen und der Quotient  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  (*absorbance ratio*) gebildet. Dieses Verhältnis liefert eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung und somit über die Qualität der Präparation der Gesamt-RNA (Okamoto und Okabe 2000). Es wurden Werte zwischen 1,7 und 2,0 (bei einem theoretischen Optimum von 2,0) erreicht; bei Werten unterhalb von 1,7 wurde die Probe verworfen.

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung wurde von jeder RNA-Isolation ein Elektrophoresegel angefertigt, um die Qualität der RNA zu beurteilen (Abbildung 4.5b). Ungefähr 750ng der gereinigten RNA wurden dafür eingesetzt.

### 4.2.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Zuerst wurden alle Proben auf eine RNA-Konzentration von 50 $\frac{ng}{\mu l}$  eingestellt. Für die cDNA-Synthese kam das *iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit* der Firma *BIO-RAD* zum Ein-





**Abbildung 4.5:** *RNA-Isolation und Qualitätskontrolle*

(a) Homogenisation; (b) Elektrophoresegel zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA; die zytoplasmatische RNA eukaryotischer Zellen enthält ca. 95% rRNA, die aus 28S, 18S und 5S RNA zusammengesetzt ist; die Schärfe der getrennten Banden dienen als interne Marker für die Integrität der isolierten RNA.

satz. Ein Reaktionsmix (Abschnitt 4.5) zu je 15 $\mu$ l wurde gemäß der Vorlage des *Synthesis Kit* angefertigt und mit jeweils 5 $\mu$ l (250ng) RNA versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 5 Minuten bei 25°C im Inkubator erwärmt, dann die Synthese 30 Minuten bei 42°C durchgeführt und zum Schluss die *Reverse Transkriptase* 5 Minuten bei 85°C inaktiviert.

#### 4.2.4 Äquilibrierung auf $\beta$ -Actin-Standard

Um vergleichbare Ausgangskonzentrationen der synthetisierten cDNA zu erhalten, wurde eine Äquilibrierung mit  $\beta$ -Actin-Primern durchgeführt. Die Primersequenz ist in Tabelle 4.6 (S. 54) aufgeführt. Von  $\beta$ -Actin als *House-Keeping-Gen* (Stoffwechselgen) wird erwartet, dass es eine möglichst konstante Expression unabhängig von der Gewebeart aufweist. Für einen PCR-Ansatz mit 4 $\mu$ l cDNA-Template wurden 11 $\mu$ l eines Reaktions-Mixes (Tabelle 4.5, S. 53) verwendet. Tabelle 4.2 zeigt die PCR-Bedingungen. Die Darstellung

PCR-Bedingungen $\beta$ -Actin (30 Zyklen)			
	Temperatur	erster Zyklus	folgende Zyklen
Denaturierung	95,0°C	180s	20s
Annealing	60,5°C	30s	30s
Elongation	72,0°C	30s	30s

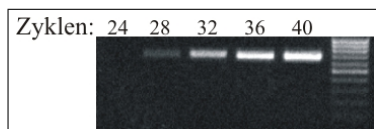
**Tabelle 4.2:** *PCR-Bedingungen für  $\beta$ -Actin*

der PCR-Produkte erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel (1%) und Ethidiumbromid. Dazu wurde 1g Agarose in 100ml 1xTAE-Puffer gelöst und 4 $\mu$ l Ethidiumbromid zugegeben. 10 $\mu$ l der Proben wurden mit 2 $\mu$ l Ladepuffer versetzt,



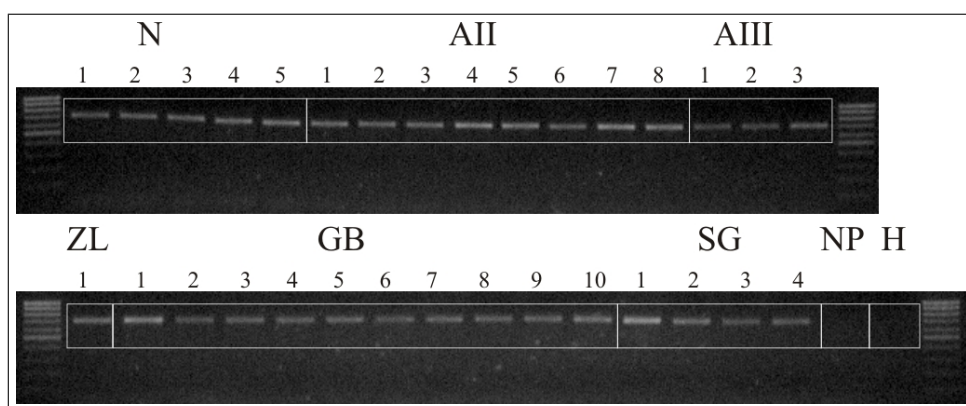
aufgetragen und bei 120V getrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker (100bp) verwendet.

Die eingesetzten cDNA-Mengen wurden solange variiert, bis die Bandenintensitäten der  $\beta$ -Actin-PCR-Produkte im Elektrophoresegel vergleichbar waren. Diese für die einzelnen Gewebeproben unterschiedlichen cDNA-Mengen kamen später zum Einsatz. Es wurde darauf geachtet, dass sich die PCR noch in der exponentiellen Amplifikationsphase befand (Abbildung 4.6). Die Abbildung 4.7 zeigt ein Elektrophorese-Gel einer PCR aller Gewebeproben mit  $\beta$ -Actin-Primern bei 30 Zyklen.



**Abbildung 4.6:** *PCR mit  $\beta$ -Actin-Primern bei 24/28/32/36/40 Zyklen*

Rechts 100bp DNA-Größenmarker; Größe des PCR-Produktes 712bp; Auswahl einer Zykluszahl von  $>28$  (Auftreten eines PCR-Produktes) und  $<36$  (vermutliches Erreichen der Sättigung), um Äquilibrationsexperimente durchzuführen.



**Abbildung 4.7:**  *$\beta$ -Actin-Äquilibration mit 30 PCR-Zyklen*

N – Normalgewebe; AII – Astrozytom II; AIII – Astrozytom III; ZL – Zelllinie 1321N1; GB – primäres Glioblastom; SG – sekundäres Glioblastom; NP – Nullprobe; H – Wasser; Größe des PCR-Produktes 712bp.

#### 4.2.5 Primerdesign

Durch die Fragestellung dieser Arbeit waren BK-Kanal-Untereinheiten vorgegeben. Die entsprechenden mRNA-Sequenzen der zugehörigen Gene wurden mit Hilfe der online Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* ermittelt.

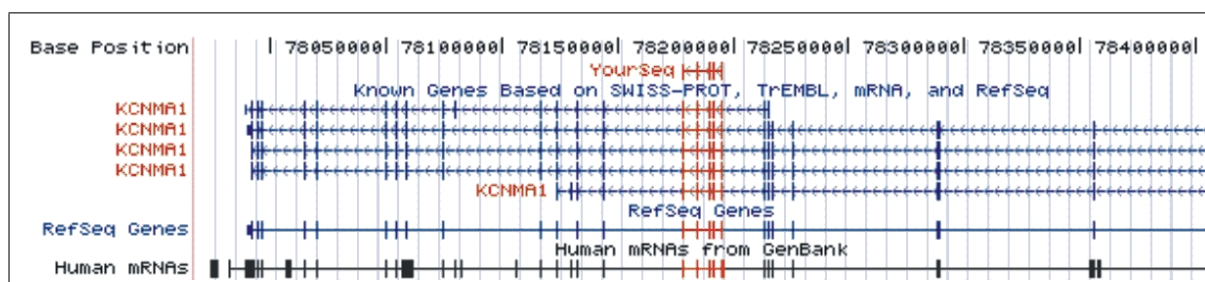
Für weitere Analysen wurden die Online-Datenbank und Softwaredienste der *University of California, Santa Cruz (UCSC)* benutzt. Durch den Vergleich der recherchierten mRNA-Sequenzen mit dem gesamten humanen Genom ließen sich Abschnitte mit Homologien zu anderen Genen sowie Splicevarianten dieser Gene ermitteln. Eine Region wurde dann ausgewählt, wenn sie (1) keine starken Homologien zu anderen Genen aufwies, (2) mehrere Exons überspannte und (3) keine alternativen Splicestellen enthielt. Die exon-übergreifende Sequenz stellt sicher, dass ausschließlich cDNA amplifiziert wird und Verunreinigungen durch genomische DNA einen minimalen Einfluss auf das PCR-Produkt haben.

Bei der Auswahl der Primersequenzen wurde darauf geachtet, dass (1) die Annealing-Temperatur zwischen 58°C und 68°C lag, (2) die Primer keine Palindrome enthielten und somit keine Sekundärstrukturen bildeten und (3) das 5'-Ende des Primers ein G oder ein C enthielt, um eine besonders starke Template-Bindung zu ermöglichen. Weiterhin sollten die entstanden Primerpaare (4) keine komplementären Enden besitzen, um Primer-Dimere zu verhindern, und (5) in ihrer Annealing-Temperatur nicht mehr als 2K auseinanderliegen.

Die Identität der spezifischen PCR-Produkte wurde sichergestellt, indem sie sequenziert und kloniert wurde. Die Tabelle 4.6 auf Seite 54 zeigt die verwendeten Primer.

### Primer für die Untereinheiten des BK-Kanals

Für die PCR-Experimente wurden Primer für die  $\alpha$ -Untereinheit und die vier verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals ausgewählt. Für die  $\alpha$ -Untereinheit (BK- $\alpha$ ) wurde eine DNA-Sequenz gewählt, die 5 Exons enthielt und in allen Splicevarianten vorkommen (Abbildung 4.8). Für die  $\beta$ -Untereinheiten BK- $\beta_1$ , BK- $\beta_2$  und BK- $\beta_4$  wurden ebenfalls



**Abbildung 4.8:** *Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit*

PCR-Produkt des benutzten Primerpaares (*YourSeq*) und 5 Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit (*KCNMA1*) – die Sequenz *YourSeq* ist in allen 5 Splicevarianten vorhanden; *YourSeq* enthält 5 Exons (|); recherchiert mit <<http://genome.ucsc.edu>>.

drei Exons ausgesucht, die in allen Splicevarianten vorkommen. Für die  $\beta$ -Untereinheit BK- $\beta_3$  existiert keine Splicevariante, auch hier wurde eine Region mit 3 Exons gewählt. Für die  $\beta$ -Untereinheiten BK- $\beta_1$  und BK- $\beta_2$  wurde jeweils ein weiteres alternatives Primerpaar ausgesucht, so dass sich die Zielregionen mit den anderen Primerpaaren nicht überschneiden.

### Primer für gliomspezifische Splicevariante des BK-Kanals

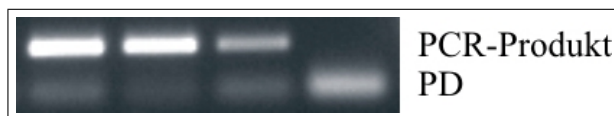
Um eine gliomspezifische Splicevariante (Liu et al. 2002) zu untersuchen, wurden zusätzlich zwei weitere Primerpaare ausgewählt. Das erste Primerpaar entsprach der gleichen, nicht exon-übergreifenden Sequenz, wie sie von Liu et al. (2002) verwendet wurde, während das zweite Primerpaar eine exon-übergreifende Sequenz der gliomspezifischen Splicevariante *gBK* amplifizieren sollte (Tabelle 4.6).

## 4.2.6 Isoform-spezifische PCR

### Optimierung der PCR-Bedingungen

Da die verschiedenen Primer bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ihre optimale Effizienz entwickeln, wurden verschiedene Versuchsreihen zur Bestimmung der jeweils optimalen Bedingungen für jedes Primerpaar durchgeführt. Die Reaktionsprotokolle wurden hinsichtlich der Annealingtemperatur und der eingesetzten Substanzen systematisch variiert. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und in Bezug auf Intensität, Reinheit und Größe der resultierenden Banden bewertet.

Während einigen PCRs mit Primern für die Untereinheiten des BK-Kanals traten bei Zyklenzahlen größer 32 Template-unabhängige Primerinteraktionen auf, die zur Entstehung eines unspezifischen Produktes in Form von nicht charakteristischen Banden im Elektrophoresegel führten (*Primer-Dimere*). Es handelte sich dabei nicht um eine Primerfront (Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9:** Gelelektrophorese mit *Primer-Dimeren*

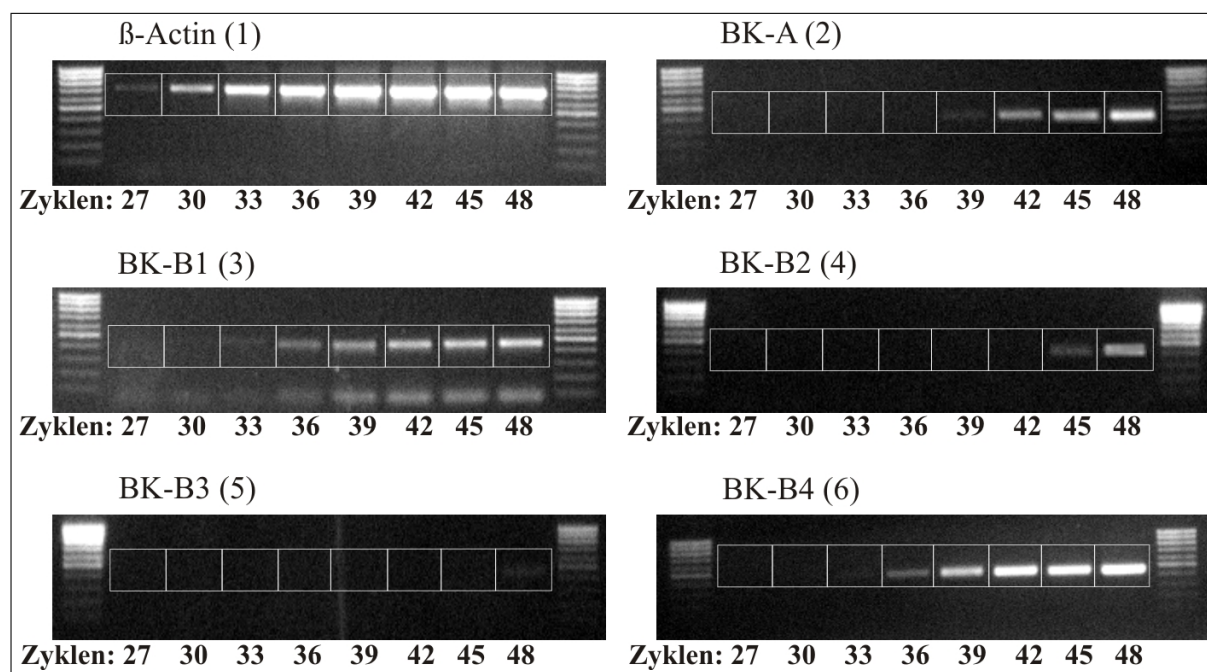
PCR mit  $\beta$ -Actin-Primern bei 32 Zyklen; obere Bande: spezifisches PCR-Produkt, untere Bande: PD (Primer-Dimere).

Durch PCR mit *HotStart* (Brownie et al. 1997) – dabei wird die Taq erst nach dem

ersten Denaturierungsschritt der PCR dazu gegeben – konnte die Entstehung dieser unspezifischen Produkte verhindert werden. Deshalb wurden nachfolgend ausschließlich PCR-Experimente mit *HotStart* verwendet. Das letztendlich verwendete Protokoll zeigt die Tabelle 4.5 (S. 53).

## Reaktionsparameter

Für den Reaktionsmix wurden die Primer in einer Konzentration von  $10 \frac{\text{pmol}}{\mu\text{l}}$  verwendet. Das Gesamtvolumen der PCR lag bei  $15 \mu\text{l}$ . Die benötigte Zyklenzahl für das Auftreten des jeweiligen spezifischen PCR-Produktes wurde durch Experimente mit zunehmenden Zyklenzahlen ermittelt (Abbildung 4.10). Es wurde darauf geachtet, dass sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet.



**Abbildung 4.10:** Gelelektrophorese der PCR aller BK-Primer bei verschiedenen Zyklen. Spezifische PCR-Produkte:  $\beta$ -Actin 712bp, BK- $\alpha$  395bp, BK- $\beta_1$  436bp, BK- $\beta_2$  391bp, BK- $\beta_3$  418bp, BK- $\beta_4$  421bp. Anhand des 100bp DNA-Leiters kann die Spezifität des PCR-Produktes verifiziert werden (jeder PCR-Durchgang wurde standardmäßig dreimal wiederholt).

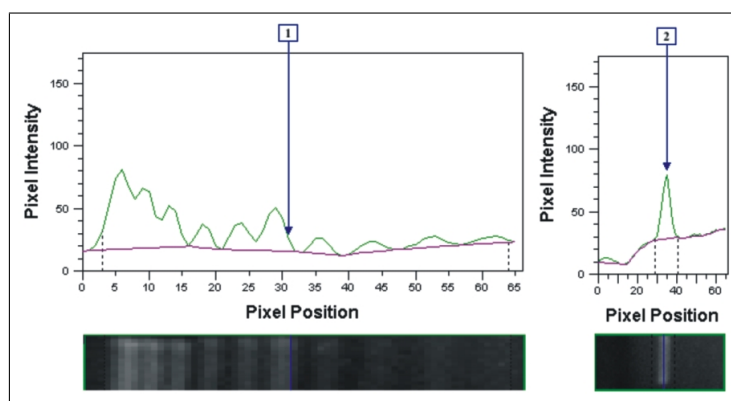
## 4.2.7 Auswertung

### Digitalisierung

Das Scannen der Elektrophoresegele wurde mit dem System *Image Master*® *VDS* der Firma *Pharmacia Biotech* und der Steuerungssoftware *LisCap Version 2.0* realisiert. Das gescannte Bild wurde im Bildformat *TIFF (Tag Image File Format)* mit einem Kompressionsfaktor von 1.0 und einer Auflösung von 746x582 Punkten mit 265 Farben (Grauskala) digital gespeichert.

### Normalisierung

Die densitometrischen Ausmessungen der Elektrophoresegele wurden mit dem Programm *ImageMaster TotalLab v2.0* der Firma *Amersham Pharmacia Biotech* durchgeführt. Dafür wurde das gespeicherte Bild in der Software geladen und der Bildausschnitt einschließlich Laufbanden manuell definiert. Zur Kalibrierung wurde die Kalibrierungsfunktion der Software benutzt. Dabei wurde die Wasserbande mit dem Wert 1 und die Summe aller Banden des 100bp DNA-Leiters mit dem Wert 100 definiert. Gemessen und als Daten verwendet wurden die Flächen unter den Kurven (*Volume*) der definierten Bandenbereiche (Abbildung 4.11). Diese Daten wurden im weiteren Verlauf der Untersuchung



**Abbildung 4.11:** Densitometrische Auswertung einer Gelelektrophorese

Gemessen wurde die Fläche unter der Kurve (*Volume*); links (1) – Ausmessung des 100bp DNA-Leiters (10 Maxima entsprechen 10 Banden); rechts (2) – Ausmessung einer  $\beta$ -Actin-Bande.

benutzt, um die Messergebnisse bei der Verwendung von BK-Primern auf  $\beta$ -Actin zu normalisieren. Dafür wurde für jede Probe folgendes Verhältnis (*Ratio*) gebildet:

$$\text{normalisiertes Volume} = \frac{\text{Volume der PCR mit BK-Primern}}{\text{Volume der PCR mit } \beta\text{-Actin-Primern.}}$$

Eine vergleichbare Methode ist etabliert (Yamaguchi et al. 2003).

Zur Darstellung verschiedener Messergebnisse in einer einheitlichen Skala, wurden alle Daten eines Experimentes zum Abschluss durch den jeweils größten Grauwert dividiert (Skalierung auf 1). Dadurch wurden alle Ergebnisse in dem Intervall  $[0; 1]$  dargestellt.

## Statistische Methoden

Die statistische Auswertung sowie graphische Darstellung der normalisierten Daten (siehe vorheriges Kapitel) erfolgte unter Verwendung der *SPSS*-Software für Windows *Release 12.0.0* (*Statistical Package for Social Science*, Inc. Chicago, IL, USA) und *Microsoft Excel 2004* (*Microsoft*, Redmond, WA, USA) mit der Softwareerweiterung *WinSTAT*® für *Excel Version 2003.1*.

### Graphische Darstellung

Für eine graphische Darstellung der normalisierten Daten wurden Methoden der deskriptiven Statistik benutzt (*Boxplots* und eine Mittelwertdarstellung).

In der Darstellung mit *Boxplots* stellt die schwarze Linie innerhalb des Rechtecks (*box*) den Median der Variablen dar. Die obere und untere Begrenzung des Rechtecks entspricht der 25. und 75. Perzentile – 50% der Daten liegen somit innerhalb des Rechtecks. Minimal- und Maximalwerte sind durch ein  $+$  gekennzeichnet.

### Statistische Tests

Die Verwendung von *Rank-Cases* der Software SPSS 12.0 ermöglichte eine Zweiteilung aller normalisierten Grauwerte anhand eines von der Software ermittelten Grenzwertes. Um zu zeigen, dass sich verschiedene Gruppen mit unabhängigen Variablen in einem Datensatz voneinander unterscheiden lassen, wurde die *ANOVA* (*Analysis of Variance*) eingesetzt. Voraussetzung ist allerdings eine Normalverteilung der Variablen. Von den hier erhobenen Daten war nicht bekannt, welcher Verteilung sie unterliegen – auch war der Probenumfang zu gering, um einen sinnvollen Test zur Bestimmung der Verteilung durchzuführen. Deshalb wurden zur statistischen Auswertung Testverfahren für parameterfreie, unverbundene Variablen benutzt.

Mit Hilfe des *Kruskal-Wallis-Tests* (*Ranking-Test*) und des *Median-Tests* wurde zunächst die  $H_0$ -Hypothese geprüft, dass alle Proben der selben Population entspringen. Konnte diese Hypothese zugunsten der  $H_A$ -Hypothese (die Proben entstammen unterschiedlichen Populationen) abgelehnt werden, wurden Untersuchungen mittels *U-Test* nach *Mann-Whitney* und *Wilcoxon* (entspricht einem T-Test mit *Ranking*) durchgeführt. Die Signifikanz der statistischen Tests wurde auf dem 5%-Niveau gesichert.

## 4.3 Microarray-Experimente

### 4.3.1 Der Human Genome U95 Av2 Array

Für eine Analyse mit dem *Human Genome U95Av2 Array (HG-U95Av2)* der Firma *Affymetrix* wurden geeignete Proben ausgewählt. Entscheidend für die Auswahl war eine hohe RNA-Konzentration und ein in der histologischen Beurteilung des Gewebes bestätigter hoher Anteil vitaler Zellen bei ausschließlichem Tumor- oder ausschließlichem Normalgewebe. Ausgesucht wurden 3 *Normalgewebe*, 4 *Astrozytome Grad II(WHO)* und 5 *Glioblastome*.

Von diesen 12 Proben (gekennzeichnet in Tabelle 4.1, S. 32) wurden 50ng RNA zur *Microarray*-Untersuchung an die Universität Leipzig geschickt. Mit der Software *Microarray Suite 5.0* wurden aus den *Microarray*-Rohdaten die *Signalwerte* gewonnen. Für das weitere Arbeiten mit diesen Daten wurde eine Liste von Ionenkanälen erstellt, welche auf diesem *Microarray* enthalten waren. Schlüsselworte für die Suche in der Affymetrix-Datenbank waren: *ion channel*, *cation*, *transport protein* und *voltage gated* (Verknüpfung durch "or"). Auf diese Weise wurden 201 Gene von Ionenkanälen – darunter drei verschiedene Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit (BK- $\alpha$ ) und eine Sequenz der  $\beta_1$ -Untereinheit (BK- $\beta_1$ ) des BK-Kanals – ermittelt.

### 4.3.2 Analyse und Darstellung von Microarray-Daten

Beim Auslesen eines *Microarrays* entstehen enorme Datenmengen. Um diese Datenmengen zu verwalten, zu organisieren und Informationen aus ihnen zu gewinnen, muss man auf viele verschiedene komplexe Methoden zugreifen (Sturn 2000).

Zur Analyse eines *Microarrays* werden Bildanalyseprogramme benutzt, welche die Expression der Gene durch Quantifizierung der Fluoreszenzen auf den gescannten Bildern auswerten und somit Aussagen über die Aktivität einzelner Gene treffen. Hohe Intensität bedeutet hohe Aktivität, niedrige Intensität bedeutet niedrige oder fehlende Aktivität. Zur Darstellung von Daten, die aus einem Microarray gewonnen wurden, kommen im wesentlichen zwei verschiedene Verfahren zur Anwendung: eine Expressionsmatrix (1) und die graphische Darstellung (2).

#### Expressionsmatrix

Stellt eine Matrix  $X$  der Größe  $n \times m$ , wobei  $n$  die Anzahl der Gene und  $m$  eine Anzahl von Experimenten oder unterschiedlichen Proben ist, die gesamten Expressionsdaten

dar, dann ist  $x_{ij}$  das  $\log_2$  Ratio des  $i$ -ten Gens der  $j$ -sten Probe.

$$x_{ij} = \log_2 \frac{C5_{ij}}{C3_{ij}} \quad (4.1)$$

$C5_{ij}$ : Cy5-Fluoreszenz eines Gens  $i$  in Probe  $j$

$C3_{ij}$ : Cy3-Fluoreszenz eines Gens  $i$  in Probe  $j$

$x_{ij}$  ist somit negativ, wenn  $C3 > C5$ , 0 wenn  $C3 = C5$  und positiv wenn  $C3 < C5$ . Das bedeutet,  $x_{ij}$  ist positiv, wenn das Gen  $i$  der Probe  $j$  hochreguliert ist, und  $x_{ij}$  ist negativ, wenn das Gen  $i$  der Probe  $j$  herunterreguliert ist. Tabelle 4.3 zeigt eine mögliche Expressionsmatrix.

	<i>Probe 1</i>	<i>Probe 2</i>	<i>Probe 3</i>
<i>Gen 1</i>	-0,002	0,003	0,001
<i>Gen 2</i>	-0,002	0,000	-0,023
<i>Gen 3</i>	0,010	0,002	-0,015
<i>Gen 4</i>	0,000	-0,023	0,001
<i>Gen 5</i>	0,003	-0,001	0,000

**Tabelle 4.3:** *Beispiel einer Expressionsmatrix*

Im Beispiel ist Gen 1 der Probe 2 hochreguliert, Gen 2 der Probe 3 und Gen 4 in Probe 2 herunterreguliert; Gen 3 und Gen 5 zeigen eine eher oszillierende Expression.

## Graphische Darstellung

Bei sehr großen Datensätzen ist es sinnvoll, die Daten in graphischer Form darzustellen. Dafür wird für jeden Datenpunkt  $x_{ij}$  eine Farbe gewählt, die seiner gemessenen Qualität und Quantität entspricht. Üblicherweise werden Gene mit  $\log_2$  Ratio von 0 (indifferent) schwarz, hochregulierte Gene ( $\log_2$  Ratio  $> 0$ ) rot und herunterregulierte Gene ( $\log_2$  Ratio  $< 0$ ) grün dargestellt. Dabei werden Gene mit um so intensiveren Farbtönen dargestellt, je stärker ihr  $\log_2$  Ratio von 0 abweicht (Sturn et al. 2002).

### 4.3.3 Verfahren zur Normalisierung von Microarray-Daten

Um die extrahierten Daten weiter zu verwenden und bestimmten Fragestellungen anzupassen, stehen verschiedene Techniken zur Normalisierung zur Verfügung.



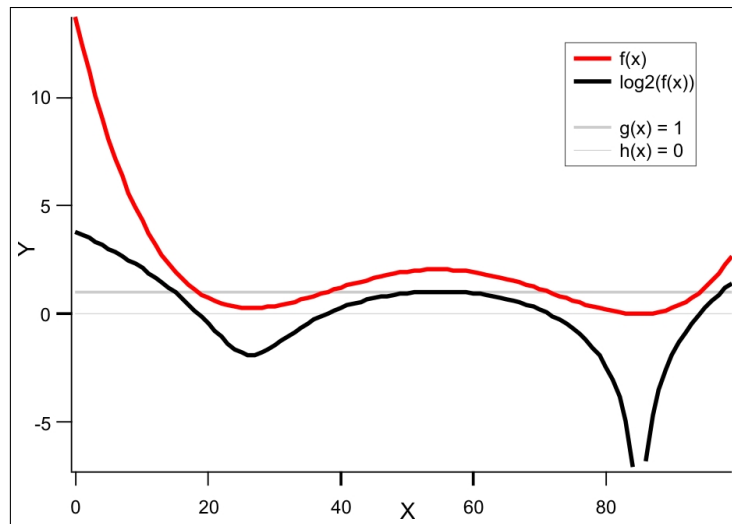
## Logarithmische Transformation

Die Ergebnisse eines *Microarrays* werden zunächst als Ratio der Fluoreszenzintensität dargestellt:

$$x_{ij} = \frac{C5_{ij}}{C3_{ij}} \quad (4.2)$$

Dabei entspricht der Bereich  $1 < x_{ij} < +\infty$  einer Hochregulation und der Bereich  $0 \leq x_{ij} < 1$  einer Herunterregulation des entsprechenden Genes. Die sehr unterschiedlichen Intervallgrößen, die eine Veranschaulichung der Daten erschweren, können durch logarithmische Transformation in Intervalle überführt werden, die besser vergleichbar sind (Abbildung 4.12). Ein hochreguliertes Gen liegt danach im Intervall  $0 < x_{ij} < +\infty$ , während ein herunterreguliertes Gen im Intervall  $-\infty < x_{ij} < 0$  liegt. Indifferente Gene bekommen den Wert 0.

Für die Logarithmierung werden der *logarithmus dualis* ( $\log_2$ ), der *logarithmus naturalis* ( $\ln$ ) und der *dekadische Logarithmus* ( $\log_{10}$ ) verwendet (Eisen et al. 1998).



**Abbildung 4.12:** Normalisierung – Logarithmische Transformation

Durch logarithmische Transformation von  $f(x)$  (rote Kurve) nach  $\log_2(f(x))$  (schwarze Kurve) wird das Intervall  $[0,1]$  in den negativen Wertebereich überführt, dadurch können stark negative Werte (als Zeichen einer Herunterregulation) mit stark positiven Werten (als Zeichen einer Hochregulation) verglichen werden;  $g(x)$  ist eine Linie durch  $y = 1$  und  $h(x)$  eine Linie durch  $y = 0$ .

## Mittelwert- und Medianzentrierung

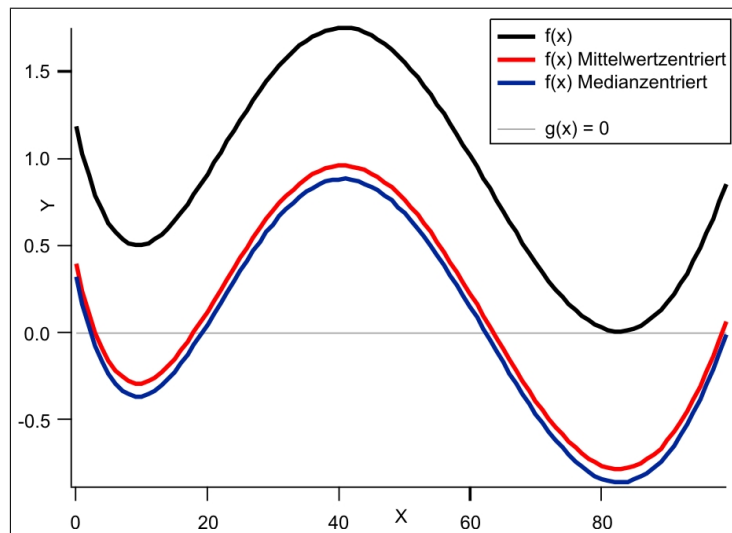
Von jedem Datenpunkt eines Arrays wird der Mittelwert und der Median abgezogen. Dadurch werden die Funktionswerte auf der Y-Achse verschoben.

$$\text{Mittelwertzentrierung: } y_i = x_i - \bar{x} \quad (4.3)$$

$$\text{Medianzentrierung: } y_i = x_i - x_{med} \quad (4.4)$$

$\bar{x}$  ist der Mittelwert der Elemente  $x_i$ ;  $x_{med}$  ist der Median der Elemente  $x_i$

Als Ergebnis besitzen die zentrierten Werte einen Mittelwert oder Median von 0 (Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13:** Normalisierung – Mittelwert- und Medianzentrierung

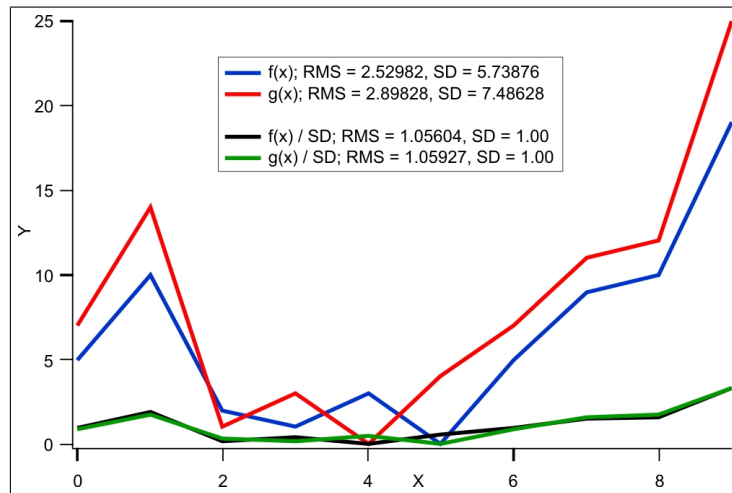
Als Folge der Zentrierung der Funktion  $f(x)$  schwingen die zentrierten Kurven um die 0-Achse; der Median (Wert in der Mitte einer sortierten Datenmenge) ist weniger anfällig für Ausreißer;  $g(x)$  ist eine Linie durch  $y = 0$ .

## Division durch Standardabweichung oder quadratischen Mittelwert

Die Division aller Funktionswerte durch einen festen Faktor bewirkt eine Streckung oder Stauchung aller Werte. Als skalarer Faktor bietet sich die Standardabweichung (SD - *standard deviation*) oder der quadratische Mittelwert (RMS - *root mean square*) an. Als

Folge nimmt die Standardabweichung oder der quadratische Mittelwert einen Wert von 1 an (Abbildung 4.14).

$$y_i = \frac{x_i}{RMS_i} \quad \text{oder} \quad y_i = \frac{x_i}{SD_i} \quad (4.5)$$



**Abbildung 4.14:** Normalisierung – Division durch Standardabweichung (SD)

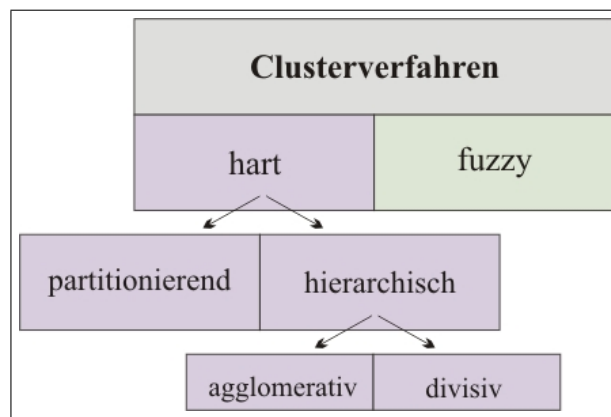
$f(x)$  und  $g(x)$  wurden durch SD dividiert; durch Division eines skalaren Faktors wurden beide Kurven gestaucht; da die Werte beider Kurven durch ihre SD dividiert wurden, besitzen die skalierten Kurven eine SD von 1.

#### 4.3.4 Clusterverfahren

Clusterverfahren unterteilen (partitionieren) eine gegebene Menge von Objekten anhand eines Ähnlichkeitskriteriums in Cluster (Anderberg 1973, Everitt 1993, Händel 2003). Im Wesentlichen sollen dabei Objekte mit ähnlichen Eigenschaften zusammengefasst werden – Elemente in einem Cluster sollen möglichst hohe Ähnlichkeit besitzen, während die Cluster untereinander möglichst unterschiedlich sein sollen. Zwei verschiedene Strategien sind dabei abzugrenzen:

1. *Unüberwachtes Clustern:* Die Gruppenzugehörigkeit der Elemente ist unbekannt. Gesucht werden Möglichkeiten, die Elemente zusammenzufassen.
2. *Überwachtes Clustern:* Zu Beginn ist die Gruppenzugehörigkeit der Elemente bekannt. Man sucht nach Gesetzmäßigkeiten, um diese Zugehörigkeit möglichst gut zu beschreiben.

Man unterscheidet *harte Clusterverfahren*, bei denen jedes Objekt nur einem Cluster zugeordnet werden kann, von *Fuzzy-Clusterverfahren*, die es einem Objekt erlauben, in mehreren Clustern zur gleichen Zeit zu sein (Höppner und Klawonn 2000, Jain und Flynn 2000). Weiter kann man *harte Clusterverfahren* danach einteilen, ob sie eine einzige Partition (*partitionierendes Verfahren*) oder eine Reihe von aufeinander folgenden Partitionen (*hierarchisch*) erzeugen (Jain und Flynn 2000). *Hierarchische Verfahren* arbeiten meist *divisiv*, das bedeutet, dass zu Beginn jedes Element einer Menge einen eigenen Cluster bildet und dann iterativ Elemente zusammengefasst werden, bis nur noch ein einziger Cluster vorhanden ist – *agglomeratives* Vorgehen stellt die genau entgegengesetzte Prozedur dar. Bei *agglomerativen* und *diversiven* Vorgehen wird jeder Vereinigungs- oder Aufzweigungsschritt festgehalten und lässt sich als Verwandtschaftsbaum anzeigen. Abbildung 4.15 gibt eine Übersicht über die erwähnten Clusterverfahren. Um zu beurteilen,



**Abbildung 4.15:** Übersicht über Clusterverfahren

ob Elemente zusammen in einen Cluster gehören, muss man ihre Ähnlichkeit bewerten können. Um aus zwei Eingangsvektoren  $X$  und  $Y$  die Paare  $(x_i, y_i)$  zu vergleichen, verwendet man *Ähnlichkeitsmaße*:

– **Euklidischer Abstand und Normalisierter Euklidischer Abstand**

Der *Euklidische Abstand* ist ein sehr oft genutztes Mittel zur Abstandsberechnung (Sturn et al. 2002). Im Prinzip ist der *Euklidische Abstand* die Quadratwurzel der Summe der Abstände der Eingangsvektoren  $(x_i, y_i)$ .

$$d_e = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2} \quad \text{und} \quad d_e = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2}}{\sqrt{n}} \quad (4.6)$$

Beide Vektoren  $X$  und  $Y$  müssen die gleiche Anzahl von Elementen in der gleichen Reihenfolge haben.

– **Manhattan Distanz**

Die *Manhattan Distanz* ist die Summe der absoluten Abstände der Eingangsvektoren  $(x_i, y_i)$ .

$$d_M = \sum_{i=1}^n |x_i - y_i| \quad (4.7)$$

Dieses Verfahren ist dem *Euklidischen Abstand* sehr ähnlich.

– **Pearsonscher Korrelationskoeffizient**

Der *Pearsonsche Korrelationskoeffizient* ist ein sehr gebräuchliches Mittel, um die Korrelation zweier Vektoren  $X$  und  $Y$  und der Punktepaare  $(x_i, y_i)$  zu bestimmen (Händel 2003).

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (4.8)$$

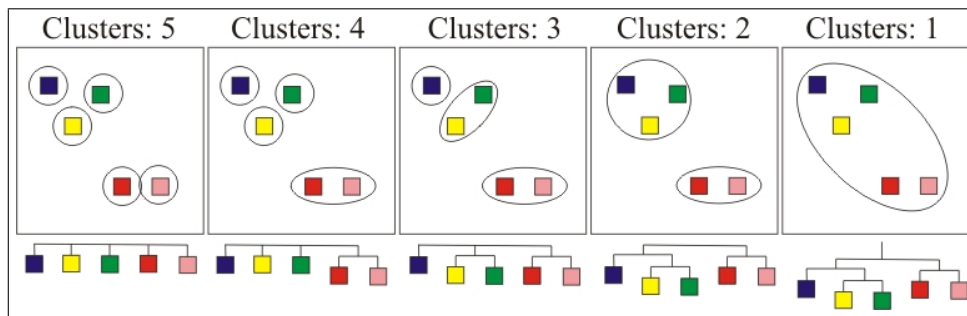
$\bar{x}$  – Mittelwert von Vektor  $X$

$\bar{y}$  – Mittelwert von Vektor  $Y$

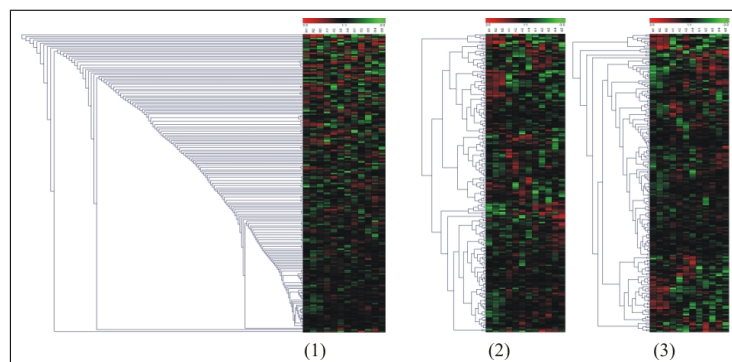
Benutzt man *standardisierte* Daten, liefert der *Pearsonsche Korrelationskoeffizient* das gleiche Ergebnis wie der *Euklidische Abstand* (Sturn 2000).

## HCL – Hierarchisches Clustering

Das *Hierarchische Clustering* ist das gebräuchlichste Clusterverfahren für Gendaten (King 1967, Sneath und Sokal 1973, Murtagh 1983). Das Ergebnis kann in Form einer Baumstruktur dargestellt werden. Typischerweise benutzt man ein agglomeratives Verfahren. Ausgehend von einer Partitionierung, in der jeder Datenpunkt einen eigenen Cluster darstellt, werden die Cluster anhand eines Ähnlichkeitskriteriums (*Ähnlichkeitsmaß*) verglichen und schrittweise miteinander vereinigt. Abgebrochen wird, wenn nur ein Cluster übrig ist oder ein Abbruchkriterium erreicht wird (Abbildung 4.16). Die Abbildung 4.17 zeigt die gebräuchlichsten agglomerativen Verfahren (Sturn 2000).



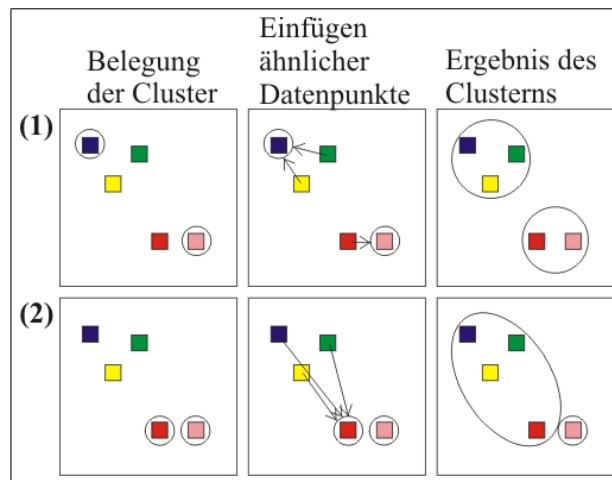
**Abbildung 4.16:** *Hierarchisches Clustern mit einem agglomerativen Verfahren*  
Verlauf des Clusters von links nach rechts; ausgehend von einer Startpartition, in der alle Datenpunkte (farbige Vierecke) eigene Cluster (Kreise) sind, werden so lange Cluster vereinigt, bis nur ein Cluster übrig bleibt.



**Abbildung 4.17:** *Verschiedene agglomerative Verfahren zum hierarchischen Clustern*  
(1) *Single-Linkage*, (2) *Complete-Linkage*, (3) *Average-Distance*

## KCL – K-Means Clustering

Beim *K-Means Clustering* (partitionierendes Verfahren) ist die Anzahl der Gruppen von Anfang an festgelegt (McQueen 1967). Wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist die Initialisierung dieser Cluster zu Beginn mit Datenpunkten. Anschließend werden die übrigen Datenpunkte dem Cluster hinzugefügt, dem sie am ähnlichsten sind (Abbildung 4.18). Da zu Beginn nicht bekannt ist, welche Datenpunkte für die Initialisierung geeignet sind, führen einige Algorithmen, ausgehend von verschiedenen Anfangsbelegungen für die Cluster, mehrere Durchläufe durch. Dadurch wird festgestellt, welches Ergebnis sich mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einstellt – dieses Ergebnis ist bei genügend hoher Anzahl von Durchläufen ein statistisches Optimum.

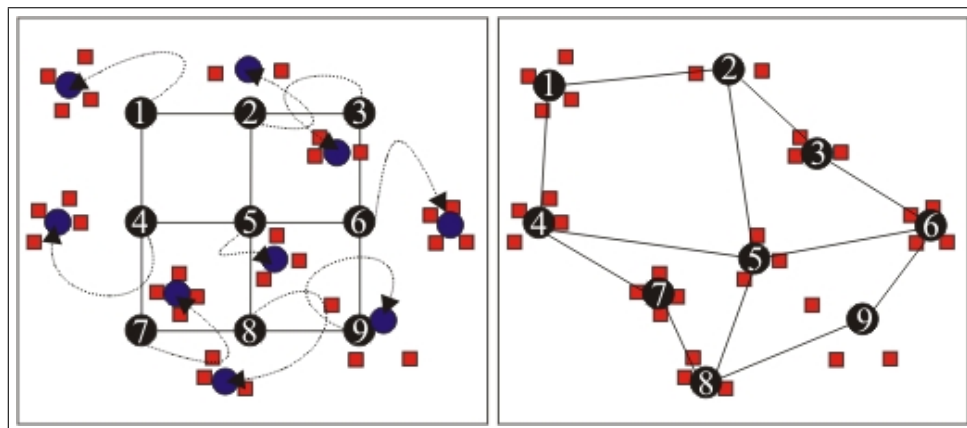


**Abbildung 4.18:** *K-Means Clustern mit 2 Clustern*

(1) günstige Anfangsbelegung, (2) ungünstige Anfangsbelegung

## SOM – Self Organizing Maps

*Self Organizing Maps* (Kohonen 2001) gehören zu den bekanntesten Anwendungen *Neuronaler Netzwerke*. Das Grundprinzip dieses Verfahrens ist ein unüberwachtes, kompetitives Lernen. Dabei wird eine Datenmenge auf eine zweite Datenmenge projiziert, welche aber weit weniger Elemente enthält. Die Abbildung 4.19 zeigt einen möglichen Lernprozess einer Datenmenge von 30 Elementen (orangene Vierecke), die auf eine zweite Datenmenge mit nur 9 Elementen (schwarze Kreise) abgebildet wird.



**Abbildung 4.19:** *Self Organizing Map*

links – Start der Anpassung der SOM, die Anfangskonfiguration der SOM (schwarze Kreise) nähert sich durch unüberwachtes kompetitives Lernen (gestrichelte Pfeillinie) einer möglichen Ausgangskonfiguration (blaue Kreise), um die Datenpunkte (orangene Vierecke) besser darzustellen; rechts – Anpassung der SOM nach mehreren Durchläufen

## ANOVA – Analysis of Variance

Die *Varianzanalyse (ANOVA)* ist ein Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten verschiedener Gruppen (Sturn et al. 2002). Die *ANOVA* kann als Verallgemeinerung des T-Tests verstanden werden:

*T-Test*: Vergleich von 2 Mittelwerten  $\mu_1$  und  $\mu_2$

*ANOVA*: Vergleich von  $m$  Mittelwerten  $\mu_1, \dots, \mu_m$ .

## PCA – Principal Component Analysis

Die *Hauptkomponentenanalyse (PCA)* ist eine variablenorientierte Methode, die Originalvariablen durch eine kleinere Anzahl *dahinter liegender* Variablen ersetzt (Jolliffe 1986, Barra 2004). Die Hauptkomponentenanalyse besteht darin, eine orthogonale Transformation der ursprünglichen Variablen in eine neue Menge unkorrelierter Variablen, die Hauptkomponenten (*principal components*) genannt werden, durchzuführen. Die Hauptkomponenten werden nacheinander in absteigender Bedeutung konstruiert, so dass sie Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen sind. Man hofft, dass die ersten Hauptkomponenten für den überwiegenden Teil der Varianz in den Originaldaten verantwortlich sind, so dass die effektive Dimension der Daten reduziert werden kann. Eine Interpretation der ersten Hauptkomponenten kann somit zum Erkennen von höheren Strukturen in den Ursprungsdaten beitragen (Raychaudhuri et al. 2000). Beispielsweise können mit Hilfe der ersten beiden Hauptkomponenten Cluster in der Daten gefunden werden.

### 4.3.5 Computergestützte Auswertung der Microarray-Daten

Für die Normalisierung und Auswertung der Daten wurden die Softwaretools *Gene Cluster 3.0* von Michael Eisen (Eisen et al. 1998), *Genesis 1.3.1* von Alexander Sturn (Sturn et al. 2002) und *Wavemetrics IgorPro 5.0* benutzt. Zur Verwaltung der *Microarray*-Daten in Form von Datentabellen wurde *Microsoft Excel 2004* (*Microsoft, Redmond, WA, USA*) eingesetzt.



## 4.4 Verwendete Materialien, Methoden und Geräte

### 4.4.1 Materialien

#### Chemikalien und Kits

<i>Chemikalien</i>
H <sub>2</sub> O als Aqua ad iniectiblia (Braun)
β-Mercaptoethanol
Ethanol (70%, 96%, absolut)
<i>Kits</i>
RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD)
<i>sonstiges</i>
Taq-Polymerase 1000U (BioTherm™)
Oligonukleotide (MWG-Biotech)

**Tabelle 4.4:** *Chemikalien und Kits*

#### Reaktionsmix und PCR-Bedingungen

<i>Reaktionsmix für cDNA-Synthese</i>			
5x iScript Reaction Mix	4,00μl		
iScript Reverse Transcriptase	1,00μl		
Nuclease-free water	10,00μl		
<b>gesamt</b>	<b>15,00μl</b>		

<i>Reaktionsmix für PCR</i>	Normal	HS-Mix 1	HS-Mix 2
H <sub>2</sub> O	8,45μl	5,80μl	2,65μl
10xPuffer	1,50μl	1,20μl	0,30μl
Primer (1pmol/μl)	0,80μl	0,80μl	–
dNTPs (1nmol/μl)	0,20μl	0,20μl	–
Taq	0,05μl	–	0,05μl
<b>gesamt</b>	<b>11,00μl</b>	<b>8,00μl</b>	<b>3,00μl</b>

**Tabelle 4.5:** *Reaktionsmix für cDNA-Synthese und PCR*

HS-Mix 1 und HS-Mix 2 entsprechen dem optimierten Reaktionsprotokoll mit Hotstart. Dabei wird die *Taq* erst nach dem ersten Denaturierungsschritt appliziert. Der initialen Denaturierung (95,0°C) folgt eine genspezifische Anzahl von Zyklen mit 95,0°C bei 20s, 60,5°C bei 30s und 72,0°C bei 30s.

## Primer

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz	PCR-Produkt
<i>Primer für Äquilibration auf <math>\beta</math>-Actin-Standard</i>		
	5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3'	712bp
	5'-GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC-3'	
<i>Primer für die Untereinheiten des BK-Kanals</i>		
BK- $\alpha$ (KCNMA1)	5'-atg ggt acc TGC GGA CAC ATC ACT CTG G-3'	395bp
	5'-atg gga tcc TCT TTC CAA TTC CAG CTC GG-3'	
BK- $\beta_1$ (KCNMB1)	5'-atg ggt acc GCC AAA CTT CCT GCT GAA GC-3'	436bp
	5'-atg gga tcc CTG CTG GTT CTG GTC CCG-3'	
BK- $\beta_2$ (KCNMB2)	5'-atg ggt acc CCG AAG AGT CTC AAT GCA CC-3'	391bp
	5'-atg gga tcc CCA GCC ATC ATA CAG GTT GG-3'	
BK- $\beta_3$ (KCNMB3)	5'-atg ggt acc GAC AGA CTA CAG TGA TGG AG-3'	418bp
	5'-atg gga tcc GTC CAG AGC ACT GTT GAG C-3'	
BK- $\beta_4$ (KCNMB4)	5'-atg ggt acc CAC CAG CTC CTG ACC AAC C-3'	421bp
	5'-atg gga tcc CCC TGT CCA TCT CCT GCG-3'	
<i>Alternative Primerpaare für die Untereinheiten des BK-Kanals</i>		
BK- $\beta_1$ (KCNMB1)	5'-atg ggt acc TGG AGA CGG GCG GGG-3'	494bp
	5'-atg gga tcc CTG CTG GTT CTG GTC CCG-3'	
BK- $\beta_2$ (KCNMB2)	5'-GAC CAT GAC CTC CTG GAC-3'	233bp
	5'-CGT GAT GGA CGC ATT CAG C-3'	
<i>Primer für gliomspezifische Splicevariante des BK-Kanals</i>		
gBK	5'-GAA GAA CAT TGT TCT TTG TGG-3'	95bp
	*)5'-CTT TGA CAG AGA AAG TTG G-3'	
	**) 5'-TTG GAA TAG CGT GAT CTA GC-3'	222bp

**Tabelle 4.6:** *Primer*

Die Tabelle enthält die Primersequenzen und die erwartete Größe der PCR-Produkte \*) von Liu et al. (2002) verwendeter *reverse*-Primer (nicht exon-übergreifend), \*\*) zusätzlich verwendeter exon-übergreifender *reverse*-Primer.

## 4.4.2 Geräte

<i>RNA-Isolation</i>
Waage
Homogenisator mit Pistill
Centrifuge 5415R (Eppendorf)
GeneQuant II (Pharmacia Biotech)
<i>RT-PCR</i>
Thermal Imaging System (Eppendorf) – Inkubator
Image Master® VDS (Pharmacia Biotech)
Thermal Imaging System FTI-500 (FUJI FILM)

**Tabelle 4.7:** *Geräte*

### 4.4.3 Software und Internet

<i>Densitometrische Auswertung und digitale Speicherung</i>		
ImageMaster TotalLab Version 2.0 (Pharmacia Biotech)		
LisCap Version 2.0; Steuerungssoftware für Image Master®		
VDS		
<i>Gene-Clustering</i>		
GeneCluster Version 3.0; Author Michael Eisen		<a href="http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm">http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm</a>
Genesis Version 1.5.0; Author Alexander Sturn		<a href="http://genome.tugraz.at/Software/">http://genome.tugraz.at/Software/</a>
<i>Tabellenkalkulation und Datenverarbeitung</i>		
Microsoft Excel 2003 (Microsoft, Redmond, WA, USA)		<a href="http://www.microsoft.com/">http://www.microsoft.com/</a>
Igor Pro 5.0 (Wavemetrics)		<a href="http://www.wavemetrics.com/">http://www.wavemetrics.com/</a>
<i>Statistiksoftware</i>		
SPSS Version 12.0, Release 12.0.0; Inc. Chicago, IL, USA		<a href="http://www.spss.com/">http://www.spss.com/</a>
WinSTAT® Statistik Add-In für Microsoft Excel		<a href="http://www.winstat.com/">http://www.winstat.com/</a>
<i>Online-Datenbanken</i>		
NCBI National Center for Biotechnology Information		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Netafix Tools für Affymetrix-Microarrays		<a href="http://www.affymetrix.com/">http://www.affymetrix.com/</a>
UCSC University of California, Santa Cruz		<a href="http://www.genome.ucsc.edu/">http://www.genome.ucsc.edu/</a>

**Tabelle 4.8:** *Software und Internet*

# 5 Ergebnisse

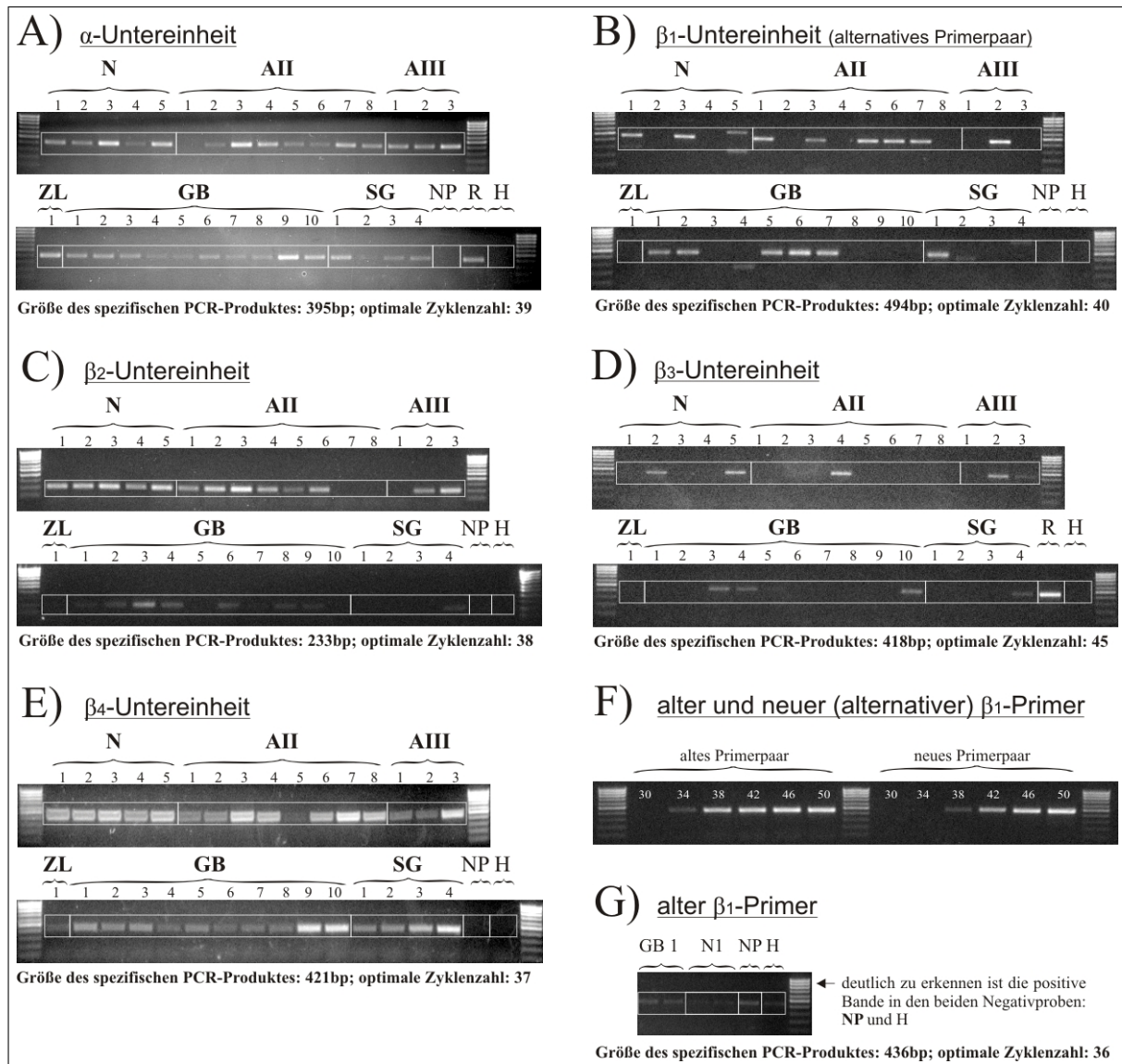
## 5.1 RT-PCR

Die PCR-Experimente wurden mit den Primern für die  $\alpha$ -Untereinheit und die vier  $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals an den äquilibrierten Proben (cDNA aus 5 Normalgeweben, 8 Astrozytome Grad II(WHO), 3 Astrozytome Grad III(WHO), 10 primäre Glioblastome, 4 sekundäre Glioblastome, Zelllinie 1321N1) durchgeführt. Als Kontrolle der PCR-Experimente wurden eine Probe, die mit Wasser als *Template* durch cDNA-Synthese hergestellt wurde (bezeichnet als NP; enthält für die Synthese der cDNA notwendige Reagenzien und dient somit als Kontrolle für eventuelle, unter der cDNA-Synthese entstandene Verunreinigungen), eine Referenz-cDNA (Positivkontrolle) und Wasser verwendet (Negativkontrolle).

Eine für die PCR-Experimente optimale Zyklenzahl (PCR-Produkt ist noch nicht im Sättigungsbereich) wurde für jedes Primerpaar getrennt ermittelt (Abbildung 5.1 und Abbildung 4.10, S. 40). Bei jedem PCR-Experiment wurde auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geachtet. Bei allen untersuchten Primerpaaren und in jeder Gewebegruppe ließ sich cDNA amplifizieren. Reproduzierbare und somit auswertbare Messergebnisse konnten jedoch nur für die  $\alpha$ -, die  $\beta_2$ - und die  $\beta_4$ -Untereinheiten gewonnen werden. Bei diesen zeigte sich eine Verminderung der Expression bei zunehmender Malignität des Gewebes (für ausführliche Beschreibung siehe folgende Unterkapitel).

Für die  $\beta_1$ - und die  $\beta_3$ -Untereinheiten stellte sich bei der Bestimmung der optimalen Zyklenzahl heraus, dass bei der eingesetzten cDNA-Menge mehr als 40 Zyklen benötigt wurden und diese zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte. Bemühungen, das Versuchsprotokoll durch Variation von Temperatur und Dauer für Denaturierung, Annealing und Elongation sowie durch Änderung der Konzentrationen der Reagenzien und deren Austausch zu optimieren (d.h. weniger als 40 Zyklen zu benötigen), blieben ohne Erfolg. Die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Experimente ließen sich nur zum Teil

bzw. gar nicht reproduzieren (standardmäßig wurden für jedes Versuchsprotokoll drei unabhängige PCR-Durchgänge durchgeführt). Die Abbildung 5.1 zeigt die Resultate der RT-PCR, welche in den folgenden Unterkapiteln näher erläutert werden.



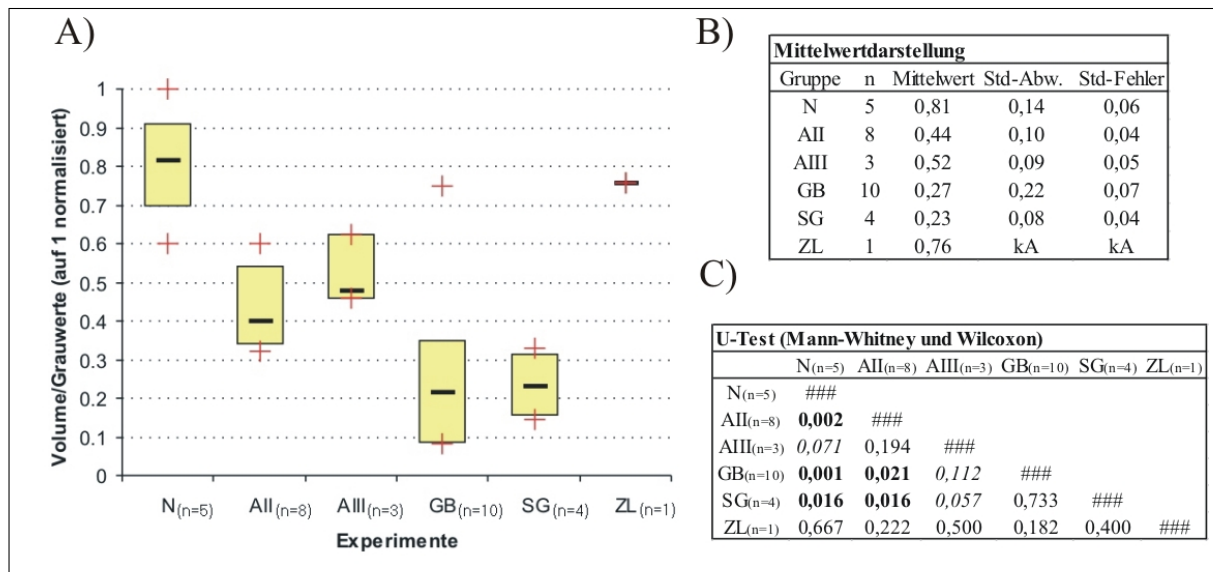
**Abbildung 5.1: Ergebnisse der PCR**

(A)-(G) Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte; angegeben ist für jedes Experiment die als optimal ermittelte Zyklenzahl; N – Normalgewebe, AII – Astrozytom Grad II(WHO), AIII – Astrozytom Grad III(WHO), ZL – Zelllinie 1321N1, GB – primäres Glioblastom, SG – sekundäres Glioblastom, NP – Nullprobe, R – Referenz (Kontroll cDNA), H – Wasserprobe.

### 5.1.1 $\alpha$ -Untereinheit

Die cDNA der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals konnte in jedem Gewebetyp nachgewiesen werden (Abbildung 5.1A). Die Auswertung durch *Rank-Cases* für 2 Gruppen in *SPSS 12.0* ergab, dass 100% aller Normalgewebe, Astrozytome Grad III(WHO) und Zelllinie 1321N1, 75% aller Astrozytome Grad II(WHO), 20% aller primären Glioblastome und 0% aller sekundären Glioblastome einen normalisierten Grauwert über 0,4 besaßen.

In der Abbildung 5.2A sind die *Boxplots* und in Abbildung 5.2B eine Mittelwertdarstellung der erhobenen Daten dargestellt.



**Abbildung 5.2:** Auswertung der Ergebnisse der  $\alpha$ -Untereinheit

Die angegebenen Grauwerte stellen den Mittelwert der 3 unabhängig von einander durchgeführten PCR-Durchgänge dar, sie wurden auf die  $\beta$ -Actin-Bande normalisiert und auf 1 skaliert; (A) Boxplots; (B) Mittelwerttabelle; (C) Signifikanztafel (exakte Signifikanzen) von paarweisen Vergleichen mit U-Test, signifikante Werte ( $p \leq 0,05$ ) sind fett und knapp am Signifikanzniveau gescheiterte sind kursiv markiert; N – Normalgewebe, AII – Astrozytom Grad II(WHO), AIII – Astrozytom Grad III(WHO), GB – primäres Glioblastom, SG – sekundäres Glioblastom, ZL – Zelllinie 1321N1; kA – keine Angabe möglich.

Die Nullhypothese, dass es keine Abweichungen zwischen den Gewebegruppen gibt, konnte nach dem *Kruskal-Wallis-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,001) und dem *Median-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,005) abgelehnt werden.

Der höchste Grauwert (1,00) und der höchste Mittelwert der Grauwerte ( $0,81 \pm 0,14$ ) wurden in der Gruppe der Normalgewebe ermittelt. Die niedrigsten Mittelwerte fanden sich in der Gruppe der primären ( $0,27 \pm 0,22$ ) und der sekundären Glioblastome ( $0,23 \pm 0,08$ ).

Die größte Heterogenität in Bezug auf Standardabweichung und Spannweite (Abstand zwischen Maximum und Minimum) zeigten die primären Glioblastome (Standardabweichung = 0,22; Spannweite = 0,67), die geringste Heterogenität (die Zelllinie 1321N1 bleibt hier unbeachtet) zeigte sich bei den Astrozytomen Grad III (Standardabweichung = 0,09; Spannweite = 0,16) und den sekundären Glioblastomen (Standardabweichung = 0,08; Spannweite = 0,19).

Die Ergebnisse von paarweisen Vergleichen der Gewebegruppen untereinander durch den *U-Test* nach *Mann-Whitney* und *Wilcoxon* sind in Abbildung 5.2C enthalten.

Der Unterschied zwischen den Gewebeentitäten ließ sich im U-Test als statistisch signifikant sichern für den Vergleich von:

- Normalgeweben und Astrozytomen Grad II ( $p = 0,002$ ),
- Normalgeweben und primären Glioblastomen ( $p = 0,001$ ),
- Normalgeweben und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,016$ ),
- Astrozytomen Grad II und primären Glioblastomen ( $p = 0,021$ ),
- Astrozytomen Grad II und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,016$ ).

Knapp am Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  gescheitert war der Unterschied zwischen Normalgeweben und Astrozytomen Grad III ( $p = 0,071$ ), Astrozytomen Grad III und primären Glioblastomen ( $p = 0,112$ ) sowie Astrozytomen Grad III und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,057$ ) – vermutlich war dies auf die geringe Anzahl von Proben in der Gruppe der Astrozytome Grad III zurückzuführen.

### 5.1.2 $\beta_1$ -Untereinheit

Für die PCR-Experimente mit Primern für die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals wurde eine optimale Zyklenzahl von 36 ermittelt. Im Ergebnis (Abbildung 5.1G) zeigte sich ein unspezifisches PCR-Produkt bei den Wasserbanden.

Durch das Verwenden eines neuen (*alternativen*) Primerpaares wurde das Entstehen dieser Banden verhindert. Für das alternative Primerpaar wurde eine optimale Zyklenzahl von 40 ermittelt. Die Abbildung 5.1F zeigt das verzögerte Entstehen eines PCR-Produktes bei Einsatz gleicher cDNA-Mengen bei ursprünglichem und neuem Primerpaar.

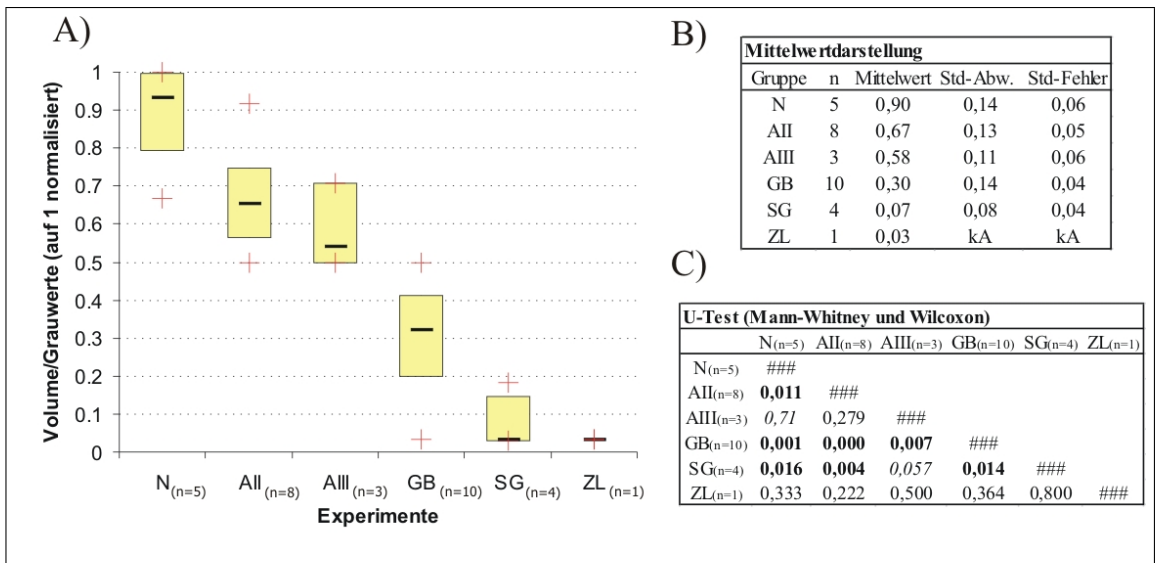
Die PCR-Experimente mit dem neuen Primerpaar zeigten bei den Wiederholungsexperimenten keine konstanten Ergebnisse. Der erkennbare Trend einer Hochregulation bei steigender Malignität, der sich bei den PCR-Experimenten mit dem alten Primerpaar

zeigte, ließ sich so nicht valide bestätigen. Abbildung 5.1B zeigt die Entstehung von unspezifischen PCR-Produkten (z.B. bei N5, GB4, SG2 und SG4).

### 5.1.3 $\beta_2$ -Untereinheit

Die PCR-Experimente mit BK- $\beta_2$ -Primern für die  $\beta_2$ -Untereinheit des BK-Kanals mit einer optimalen Zyklenzahl von 44 erbrachten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Deshalb wurde ein *alternatives Primerpaar* eingesetzt (siehe Tabelle 4.6), für das eine optimale Zyklenzahl von 38 bestimmt wurde. Mit diesen Primern konnte die cDNA der  $\beta_2$ -Untereinheit des BK-Kanals in allen Gewebetypen nachgewiesen werden (Abbildung 5.1C), wenn auch in SG und ZL in vernachlässigbar kleinen Mengen.

Die Auswertung durch *Rank-Cases* für 2 Gruppen in *SPSS 12.0* ergab, dass 100% aller Normalgewebe, Astrozytome Grad II(WHO) und Astrozytome Grad III(WHO), 10% aller primären Glioblastome und 0% aller sekundären Glioblastome und Zelllinie 1321N1 einen normalisierten Grauwert über 0,5 besaßen. In der Abbildung 5.3A sind die *Box-plots* dargestellt und die Abbildung 5.3B zeigt eine Mittelwertdarstellung der Daten.



**Abbildung 5.3:** Auswertung der Ergebnisse der  $\beta_2$ -Untereinheit

Die angegebenen Grauwerte stellen den Mittelwert der 3 unabhängig voneinander durchgeführten PCR-Durchgänge dar, sie wurden auf die  $\beta$ -Actin-Bande normalisiert und auf 1 skaliert; (A) Boxplots; (B) Mittelwerttabelle; (C) Signifikanztafel (exakte Signifikanzen) von paarweisen Vergleichen mit U-Test, signifikante Werte ( $p \leq 0,05$ ) sind fett und knapp am Signifikanzniveau gescheiterte sind kursiv markiert; N – Normalgewebe, AII – Astrozytom Grad II(WHO), AIII – Astrozytom Grad III(WHO), GB – primäres Glioblastom, SG – sekundäres Glioblastom, ZL – Zelllinie 1321N1; kA – keine Angabe möglich.



Auf einem Signifikanzniveau von 0,05 zeigten der *Kruskal-Wallis-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,001) und der *Median-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,003), dass die Grauwerte der einzelnen Gewebe nicht der gleichen Grundgesamtheit entstammen und sich folglich unterscheiden.

Der höchste Grauwert (1,00) und der höchste Mittelwert ( $0,90 \pm 0,14$ ) wurden in der Gruppe der Normalgewebe ermittelt. Der niedrigste Grauwert fand sich bei der Zelllinie 1321N1 (0,29). Die größte Heterogenität in Bezug auf Standardabweichung und Spannweite zeigten die Normalgewebe (Standardabweichung = 0,14; Spannweite = 0,33), die Astrozytome Grad II(WHO) (Standardabweichung = 0,13; Spannweite = 0,42) und die primären Glioblastome (Standardabweichung = 0,14; Spannweite = 0,47). Die geringste Heterogenität dagegen (die Zelllinie 1321N1 bleibt hier unbeachtet) fand sich bei den sekundären Glioblastomen (Standardabweichung = 0,08; Spannweite = 0,15).

Die Abbildung 5.3C zeigt die Ergebnisse von paarweisen Vergleichen der Gewebegruppen untereinander durch den *U-Test* nach *Mann-Whitney* und *Wilcoxon*. Der Unterschied zwischen den Gewebegruppen sicherte sich im U-Test statistisch signifikant für den Vergleich von:

- Normalgeweben und Astrozytomen Grad II ( $p = 0,011$ ),
- Normalgeweben und primären Glioblastomen ( $p = 0,001$ ),
- Normalgeweben und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,016$ ),
- Astrozytomen Grad II und primären Glioblastomen ( $p = 0,000$ ),
- Astrozytomen Grad II und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,004$ ),
- Astrozytomen Grad III und primären Glioblastomen ( $p = 0,007$ ),
- primären Glioblastomen und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,014$ ).

Knapp am Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  gescheitert war der Unterschied zwischen Astrozytomen Grad III und Normalgeweben ( $p = 0,071$ ) bzw. sekundären Glioblastomen ( $p = 0,057$ ). Dies lässt sich wiederum als Konsequenz der geringen Probenzahl in der Gruppe der Astrozytome Grad III deuten.

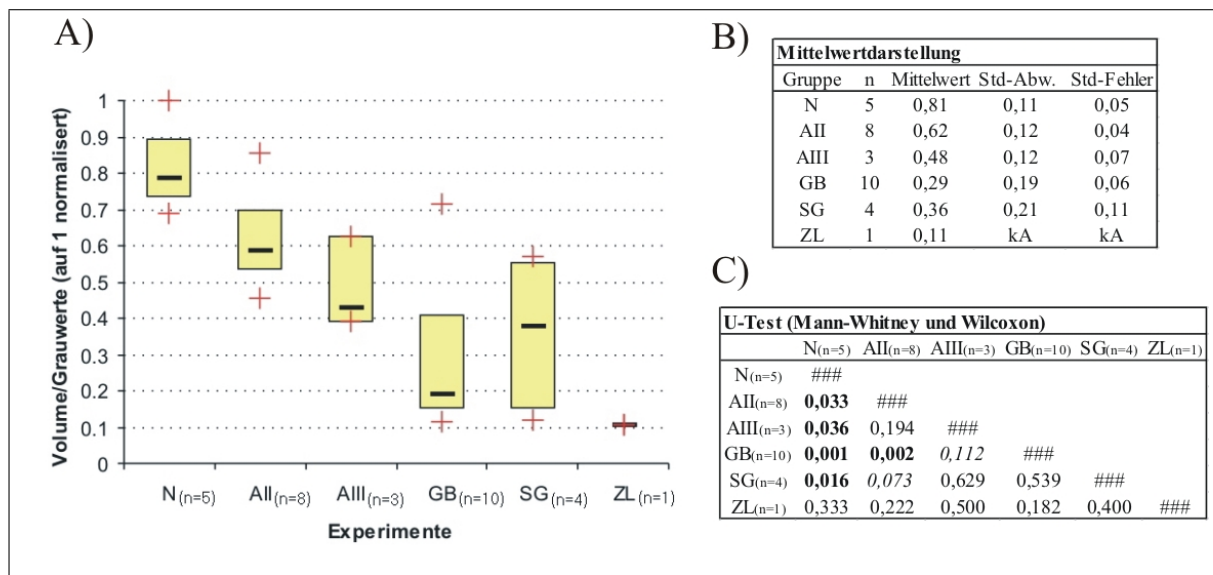
#### 5.1.4 $\beta_3$ -Untereinheit

Eine optimale Zyklenzahl von 45 wurde für die PCR-Experimente mit BK- $\beta_3$ -Primern für die  $\beta_3$ -Untereinheit ermittelt. Reproduzierbare Ergebnisse konnten durch Wiederholungsexperimente nicht erzielt werden. Die sehr hohe Zyklenzahl, die für ein spezifisches PCR-Produkt benötigt wurde, ließ auf eine sehr geringe Ausgangskonzentration der eingesetzten cDNA schließen. Weder durch intensive Literaturrecherche noch durch die Suche in Gendatenbanken ließen sich alternative Primer finden. In Abbildung 5.1D ist

ein nicht reproduzierbares Ergebnis dargestellt. Es zeigen sich trotz einer sehr hohen Zyklenzahl nur schwache Banden im Gelelektrophoresebild.

### 5.1.5 $\beta_4$ -Untereinheit

In allen Gewebetypen konnte cDNA der  $\beta_4$ -Untereinheit des BK-Kanals nachgewiesen werden (Abbildung 5.1E). Bei *Rank-Cases* für 2 Gruppen wurde ein Grauwert von 0,5 ermittelt, anhand welchem die Daten in zwei Sparten geteilt wurden. 100% aller Normalgewebe, 87,5% der Astrozytome Grad II(WHO), 50% der sekundären Glioblastome, 33% der Astrozytome Grad III(WHO), 10% der primären Glioblastome und 0% der Zelllinie 1321N1 besaßen einen normalisierten Grauwert von über 0,5. In der Abbildung 5.4A sind die *Boxplots* und in Abbildung 5.4B eine Mittelwertdarstellung der erhobenen Daten dargestellt.



**Abbildung 5.4:** Auswertung der Ergebnisse der  $\beta_4$ -Untereinheit

Die angegebenen Grauwerte stellen den Mittelwert der 3 unabhängig von einander durchgeführten PCR-Durchgänge dar, sie wurden auf die  $\beta$ -Actin-Bande normalisiert und auf 1 skaliert; (A) Boxplots; (B) Mittelwerttabelle; (C) Signifikanztafel (exakte Signifikanzen) von paarweisen Vergleichen mit U-Test, signifikante Werte ( $p \leq 0,05$ ) sind fett und knapp am Signifikanzniveau gescheiterte sind kursiv markiert; N – Normalgewebe, AII – Astrozytom Grad II(WHO), AIII – Astrozytom Grad III(WHO), GB – primäres Glioblastom, SG – sekundäres Glioblastom, ZL – Zelllinie 1321N1; kA – keine Angabe möglich.

Auf dem Signifikanzniveau 0,05 konnte durch den *Kruskal-Wallis-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,001) und den *Median-Test* (*Asymptotische Signifikanz* = 0,003) gezeigt

werden, dass die Gewebe keiner gemeinsamen Entität entspringen.

Der höchste Grauwert (1,00) und der höchste Mittelwert ( $0,81 \pm 0,11$ ) wurden in der Gruppe der Normalgewebe ermittelt. Der niedrigste Grauwert fand sich bei der Zelllinie 1321N1 (0,11). Die größte Heterogenität in Bezug auf Standardabweichung und Spannweite zeigten die primären Glioblastome (Standardabweichung = 0,19; Spannweite = 0,60) und die sekundären Glioblastome (Standardabweichung = 0,21; Spannweite = 0,45), die geringste Heterogenität (die Zelllinie 1321N1 bleibt hier unbeachtet) fand sich bei den Normalgeweben (Standardabweichung = 0,11; Spannweite = 0,31) und bei den Astrozytomen Grad III (Standardabweichung = 0,12; Spannweite = 0,23).

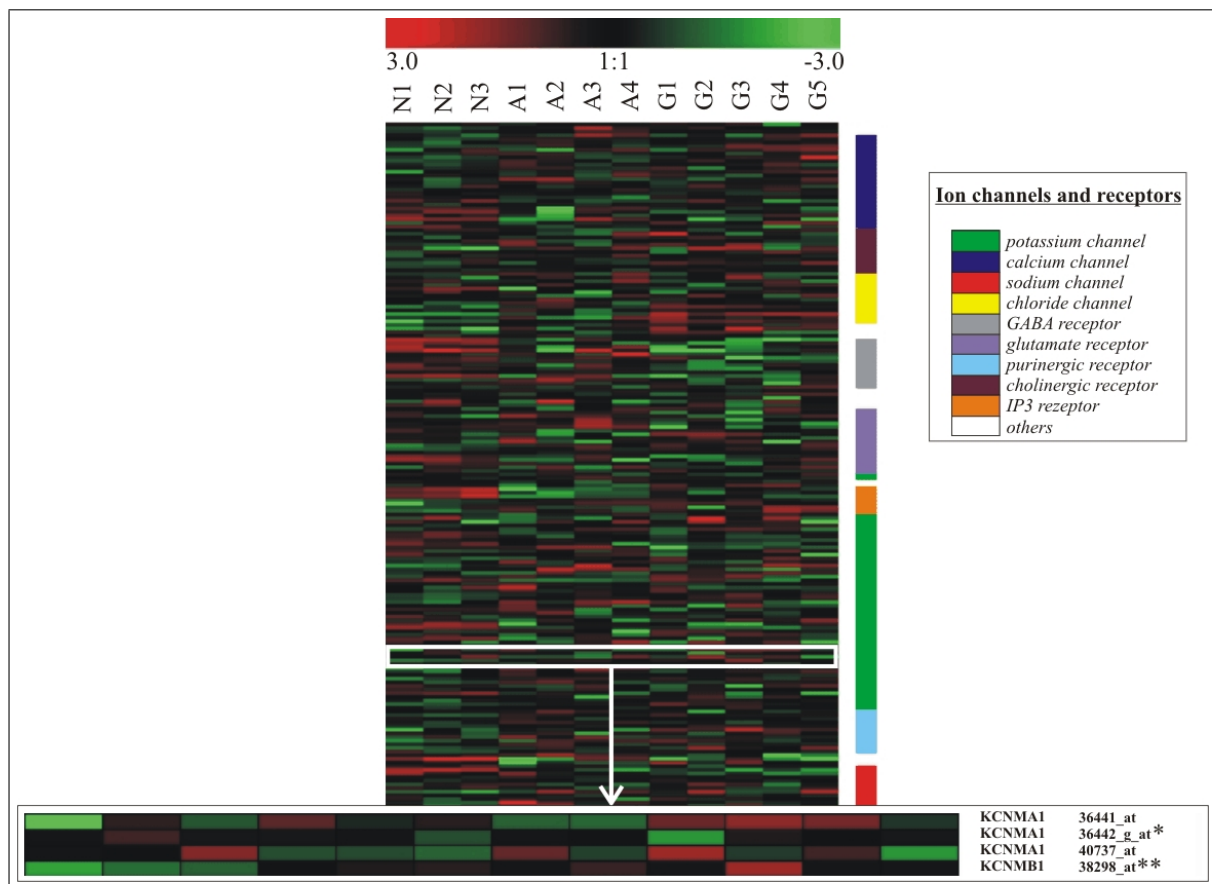
Die Ergebnisse von paarweisen Vergleichen der Gewebegruppen untereinander durch den *U-Test* nach *Mann-Whitney* und *Wilcoxon* sind in Abbildung 5.4C enthalten. Der Unterschied zwischen den Gewebegruppen sicherte sich im U-Test statistisch signifikant für den Vergleich von:

- Normalgeweben und Astrozytomen Grad II ( $p = 0,030$ ),
- Normalgeweben und Astrozytomen Grad III ( $p = 0,036$ ),
- Normalgeweben und primären Glioblastomen ( $p = 0,001$ ),
- Normalgeweben und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,016$ ),
- Astrozytomen Grad II und primären Glioblastomen ( $p = 0,002$ ).

Knapp am Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  gescheitert war der Unterschied zwischen Astrozytomen Grad II und sekundären Glioblastomen ( $p = 0,073$ ) sowie Astrozytomen Grad III und primären Glioblastomen ( $p = 0,112$ ).

## 5.2 Analyse des BK-Kanals mit dem Microarray

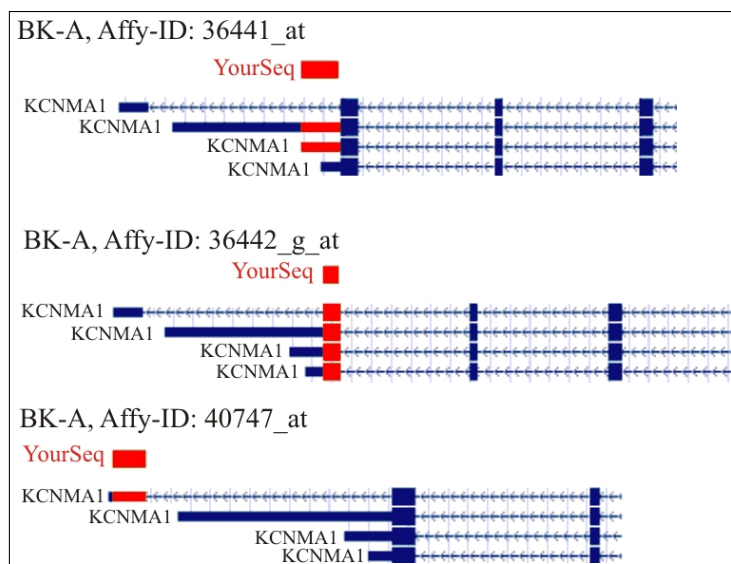
Für die Untersuchung mit dem *Microarray HG-U95Av2* der Firma *Affymetrix* wurden 12 Gewebeproben, bestehend aus 5 primären Glioblastomen, 4 niedergradigen Astrozytomen und 3 Normalgeweben ausgewählt (Tabelle 4.1). Von 12625 Genen, die auf diesem *Microarray* dargestellt werden können, wurden 201 Ionenkanäle herausgefiltert. Die Abbildung 5.5 zeigt ein *Expression-Image* dieser 201 Ionenkanäle mit einer farbigen Markierung der Kanalgruppen sowie eine isolierte Darstellung der 4 verschiedenen Sequenzen für BK-Kanäle. Eine *Online-Recherche* auf der Webseite <http://www.genome.ucsc.edu>



**Abbildung 5.5:** *Expression-Image von 201 Ionenkanälen auf Microarray*

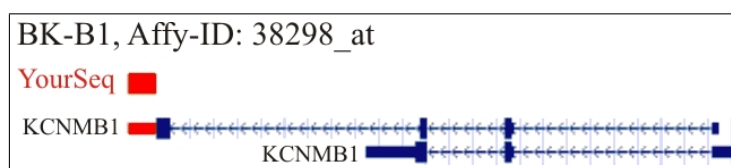
Der weiße Pfeil markiert die 4 Sequenzen des BK-Kanals (drei KCNMA1, ein KCNMB1); rechts neben der Genbezeichnung (KCNMA1 oder KCNMB1) findet sich die *Affy-ID* (Identifikator der Firma *Affymetrix*); gekennzeichnet sind die Sequenzen, die der RT-PCR mit Primern für die  $\alpha$ -Untereinheit (\*) bzw. für die  $\beta_1$ -Untereinheit (\*\*) des BK-Kanals entsprechen;  $N_{1-3}$  – Normalgewebe,  $A_{1-4}$  – niedergradige Astrozytome,  $G_{1-5}$  – primäre Glioblastome; rote Markierung – Hochregulation, grüne Markierung – Herunterregulation.

ergab, dass die drei verschiedenen Sequenzen (gekennzeichnet durch verschiedene *Affy-IDs*) für die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals (KCNMA1) unterschiedliche Gen-Regionen verschiedener Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit darstellen. Die Abbildung 5.6 zeigt, dass nur die Gensequenz mit der *Affy-ID* 36442\_g\_at alle Spliceformen der  $\alpha$ -Untereinheit enthält. Die Sequenz für die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals (KCNMB1) stellt nur eine



**Abbildung 5.6:** *Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit auf Microarray HG\_U95Av2*  
 Affy-ID – Identifikator für verschiedene Gensequenzen auf dem *Microarray*; *YourSeq* – durch den *Microarray* untersuchte Sequenz; orangenes Viereck – untersuchte Gensequenz; KCNMA1 – Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals.

von zwei in der Datenbank <http://www.genome.ucsc.edu> vorhandenen Formen dar (Abbildung 5.7).



**Abbildung 5.7:** *Isoformen der  $\beta_1$ -Untereinheit auf Microarray HG\_U95Av2*  
 Affy-ID – Identifikator für verschiedene Gensequenzen auf dem *Microarray*; *YourSeq* – durch den *Microarray* untersuchte Sequenz; orangenes Viereck – untersuchte Gensequenz; KCNMB1 – Isoformen der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals.

Ein Vergleich der Gensequenzen der BK-Kanäle mit den übrigen Gensequenzen in der selektierten Gruppe der Ionenkanäle ergab, dass alle vier Sequenzen sehr niedrige mittlere Signalwerte aufwiesen. So beträgt die Signalstärke der Gensequenz für die  $\beta_1$ -

Untereinheit des BK-Kanals (*KCNMB1*) 11,29% des Wertes des stärksten Vertreters aus der Gruppe der Ionenkanäle (*KCNJ4*) und 0,64% des stärksten mittleren Signalwertes aus allen Gensequenzen auf dem *Microarray*. Tabelle 5.1 zeigt eine Einordnung der mittleren Signalwerte (Signal-Mittelwert) der Sequenzen für BK-Kanäle in die selektierte Gruppe der Ionenkanäle und in die Gruppe aller Gene.

<b>Gruppe der Ionenkanäle auf dem Microarray</b>				
<i>Position</i>	<i>Genbezeichnung</i>	<i>Affy-ID</i>	<i>Signal-Mittelwert</i>	<i>Anteil<sub>Max</sub></i>
1	KCNJ4	36285_at	1618,12	100,00%
2	GRIA2	40746_at	1538,90	95,10%
36	<i>KCNMB1</i>	<i>38298_at**</i>	182,63	11,29%
84	<i>KCNMA1</i>	<i>36442_g_at*</i>	72,30	4,47%
108	<i>KCNMA1</i>	<i>40737_at</i>	42,88	2,65%
151	<i>KCNMA1</i>	<i>36441_at</i>	17,00	1,05%
181	KCNH1	33088_at	4,22	0,26%

<b>Gruppe aller Gene auf dem Microarray</b>				
<i>Position</i>	<i>Genbezeichnung</i>	<i>Affy-ID</i>	<i>Signal-Mittelwert</i>	<i>Anteil<sub>Max</sub></i>
1	Control sequence	AFFX-hum_alu_at	28.708,28	100,00%
2	ARPC5L	36780_at	25.929,36	90,32%
4587	<i>KCNMB1</i>	<i>38298_at**</i>	182,63	0,64%
7405	<i>KCNMA1</i>	<i>36442_g_at*</i>	72,30	0,25%
8905	<i>KCNMA1</i>	<i>40737_at</i>	42,88	0,15%
11144	<i>KCNMA1</i>	<i>36441_at</i>	17,00	0,06%
12625	CRISP1	34452_at	1,50	0,01%

**Tabelle 5.1:** *Signalwerte der Sequenzen für BK-Kanäle auf dem Microarray*

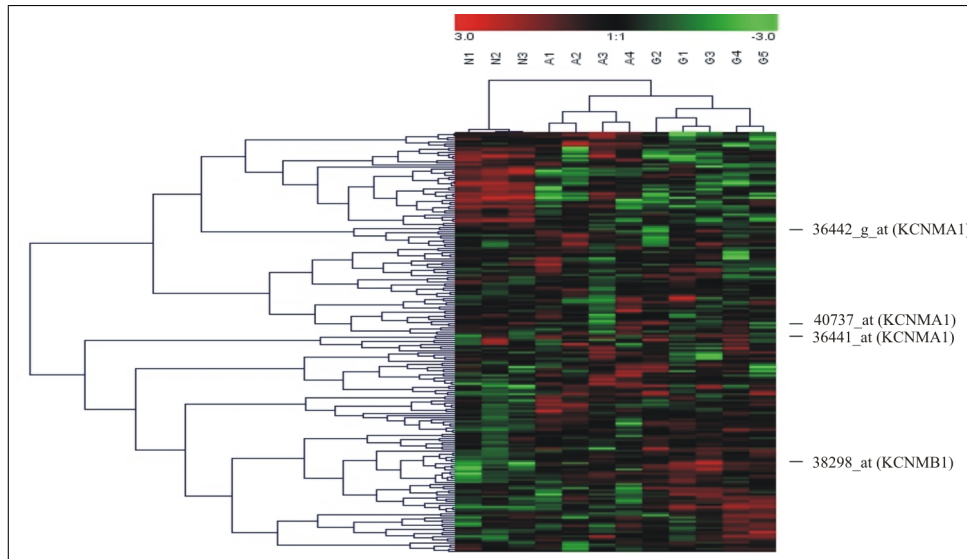
KCNMA1 und KCNMB1 sind kursiv markiert; gekennzeichnet sind die Sequenzen, die der RT-PCR mit Primern für die  $\alpha$ -Untereinheit (\*) bzw. für die  $\beta_1$ -Untereinheit (\*\*) des BK-Kanals entsprechen; Position – durch Sortierung nach Anteil<sub>Max</sub> entstandene Positionsnummer; Anteil<sub>Max</sub> – prozentualer Anteil am stärksten Signalwert einer Gruppe; *KCNJ4* ist der Vertreter mit den größten Signalwerten innerhalb der Gruppe der Ionenkanäle, eine Recherche auf der *Homepage* von Affymetrix ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) ergab, dass es sich bei *KCNJ4* um einen Kaliumkanal aus der Gruppe  $K_{ir}$  handelt: *KCNJ4*, *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4*, *chromosomal location 22q13.1*.

## 5.2.1 Hierarchical Clustering

Beim *Hierarchischen Clustern* der 201 Ionenkanäle (Abbildung 5.8) zeigte sich, dass die gefilterte Auswahl von Genen noch immer die Information zur Differenzierung von Normalgeweben, niedergradigen Astrozytomen und primären Glioblastomen enthält. Alle drei Gruppen wurden durch *Hierarchisches Clustern* mit dem Ähnlichkeitsmaß *Pearson*

*Centered Correlation* in drei getrennte Cluster aufgeteilt.

Die vier Gensequenzen für BK-Kanäle sind in vier voneinander verschiedenen Regionen des *Cluster-Trees* zu finden.



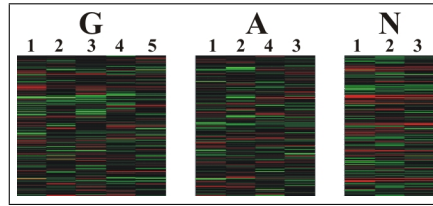
**Abbildung 5.8:** *Hierarchical Clustering (Gene und Experimente)*

Clustern der 201 Ionenkanäle; Algorithmus: *Average Linkage Clustering*; Ähnlichkeitsmaß: *Pearson Centered Correlation*; farbig markiert wurden Cluster mit BK-Kanal-Sequenzen (38298\_at – KCNMB1, 36442\_g\_at – KCNMA1, 40737\_at – KCNMA1, 36441\_at – KCNMA1); N<sub>1-3</sub> – Normalgewebe, A<sub>1-4</sub> – niedergradige Astrozytome, G<sub>1-5</sub> – primäre Glioblastome; rote Markierung – Hochregulation, grüne Markierung – Herunterregulation.

## 5.2.2 K-Means Clustering

Die drei durch *K-Means Clustering* erhaltenen Cluster in Abbildung 5.9 lassen erkennen, dass der auf Ionenkanäle reduzierte Datensatz noch immer genügend strukturgebende Informationen besitzt, um eine intakte Gruppierung der Gewebe zu gewährleisten.

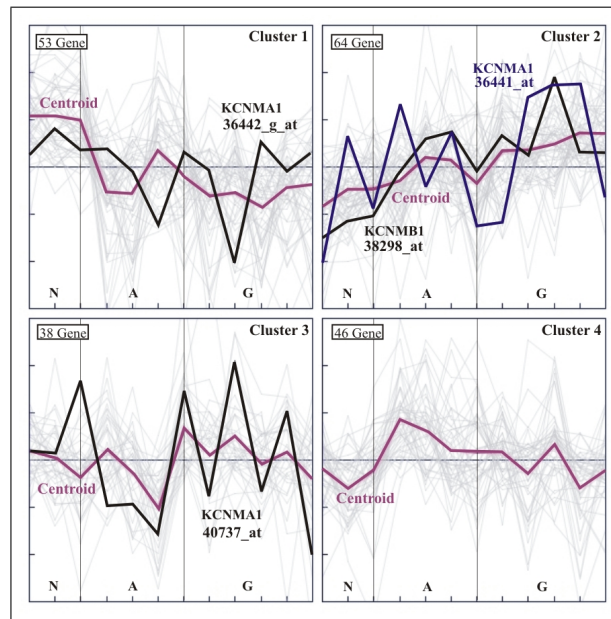
Ausgehend von der Beobachtung, dass die Gewebetypen anhand der Ionenkanäle unterschieden werden können, bestand der nächste Arbeitsschritt darin, ein *K-Means Clustering* der Gene durchzuführen. Angewendet wurde das *K-Means Clustering* für 4 Gruppen ( $k = 4$ ). Im ersten Cluster (Abbildung 5.10, links oben) fand sich die Sequenz mit der *Affy-ID 36442\_g\_at* (Sequenz für alle Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals) und zeigte die Tendenz einer Herunterregulation bei wachsender Malignität. Hingegen wurden in dem zweiten Cluster (Abbildung 5.10, rechts oben) zwei Sequenzen (KCNMB1 mit *Affy-ID 38298\_at* und KCNMA1 mit *Affy-ID 36441\_at*) für BK-Kanäle gefunden;



**Abbildung 5.9:** *K-Means Clustering für 3 Experimente*

Clustering der 201 Ionenkanäle; Iterationen: 1000; Ähnlichkeitsmaß: *Pearson Centered Correlation*; Lösung wurde 27 mal gefunden;  $N_{1-3}$  – Normalgewebe,  $A_{1-4}$  – niedergradige Astrozytome,  $G_{1-5}$  – primäre Glioblastome; rote Markierung – Hochregulation, grüne Markierung – Herunterregulation.

der Trend des zweiten Clusters ließ sich anhand der Mittellinie nachvollziehen und entsprach einer Hochregulation bei wachsender Malignität. Während sich im dritten Cluster (Abbildung 5.10, links unten) die Sequenz für KCNMA1 mit der *Affy-ID 40737\_at* ohne deutlichen Trend einer Hoch- oder Herunterregulation zeigte, beinhaltete der vierte Cluster (Abbildung 5.10, rechts unten) keine Sequenz für KCNMA1 oder KCNMB1.



**Abbildung 5.10:** *K-Means Clustering für 4 Gengruppen*

Clustering der 201 Ionenkanäle; markiert sind die Sequenzen für BK-Kanäle; Iterationen: 5.000; Ähnlichkeitsmaß: *Pearson Centered Correlation*; die violette Linie entspricht dem mittleren Kurvenverlauf in einem Cluster (Centroid).



### 5.2.3 SOM – Self Organizing Map

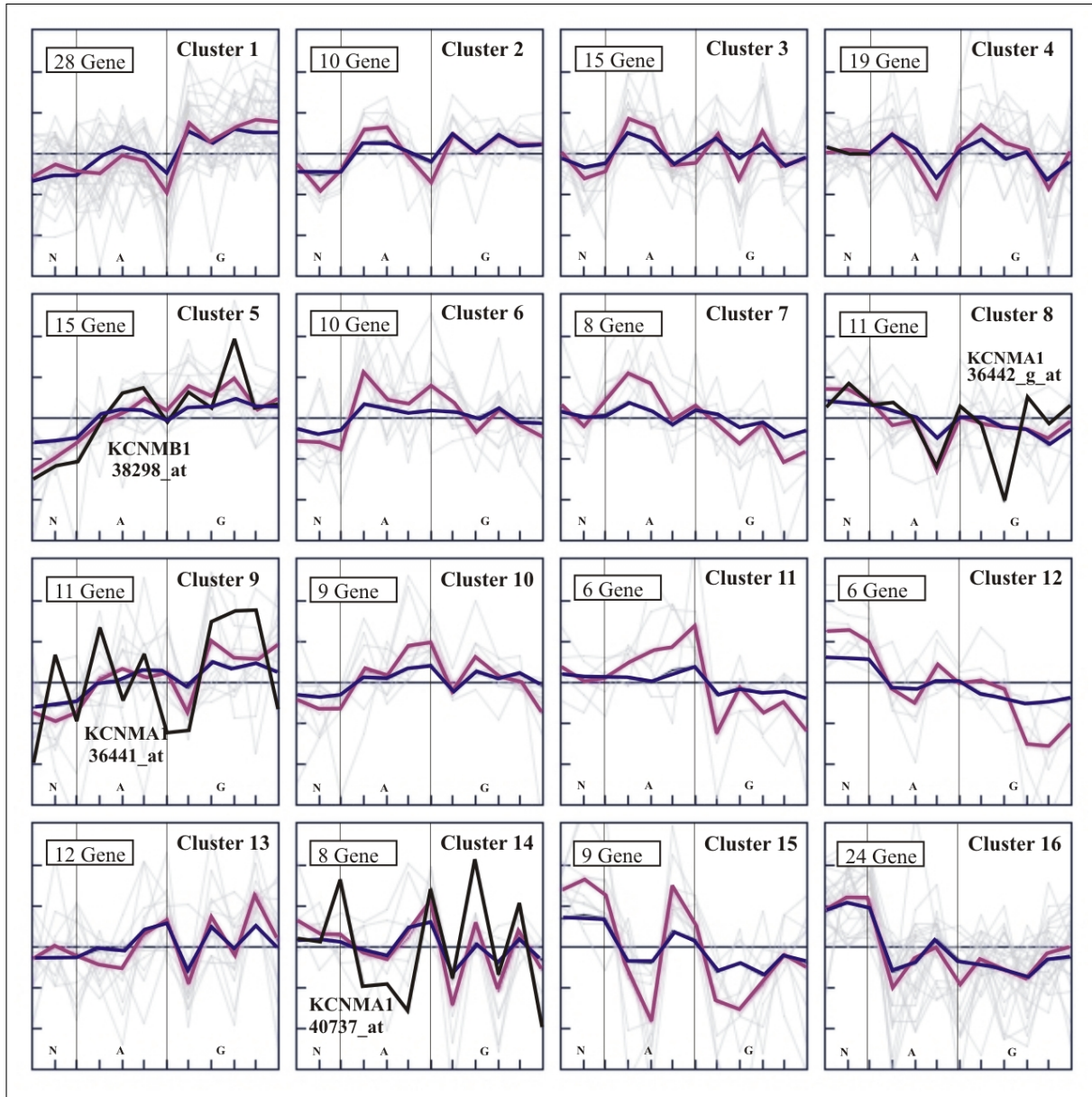
Um ein noch differenzierteres Bild der Expression der 201 Ionenkanäle zu erhalten, wurde ein SOM mit 16 Clustern ( $4 \times 4$ ), 500.000 Iterationen und *Pearson Centered Correlation* und sonst unveränderter Grundeinstellung ( $p = 0,05$ ; radius = 3,0; *Gaussian Neighbourhood-function*) dargestellt. Die für 500.000 Iterationen benötigte, sehr zeitaufwendige Berechnung des SOM gewährleistete hoch spezialisierte Cluster für die Darstellung der Daten. In Abbildung 5.11 sind die resultierenden Cluster abgebildet.

#### Sequenzen des BK-Kanals

Alle vier Sequenzen für BK-Kanäle wurden in verschiedenen Clustern abgebildet. Die Sequenzen für die  $\alpha$ -Untereinheiten des BK-Kanals waren in den Clustern 8, 9 und 14, die Sequenz für die  $\beta_1$ -Untereinheit in dem Cluster 5 angeordnet. Obwohl die Sequenz mit der *Affy-ID 36441\_at* (KCNMA1) sehr schwankende Signalwerte zeigte, entspricht sie einem Cluster mit leichter Hochregulation bei ansteigender Malignität. Im achten Cluster befand sich die Sequenz mit der *Affy-ID 36442\_g\_at* (eine Sequenz für alle Splicevarianten von KCNMA1). Dieser Cluster entsprach einer deutlichen Herunterregulation bei zunehmender Malignität. Die dritte Sequenz für KCNMA1 mit der *Affy-ID 40737\_at* fand sich im Cluster 14. Dieser enthielt im Bereich der Normalgewebe und der niedergradigen Astrozytome weitgehend konstante Signalwerte; hingegen unterlagen diese Werte bei Glioblastomen starken Schwankungen um den Mittelwert. Die Sequenz *38298\_at* (KCNMB1) im Cluster 5 entsprach einer deutlichen Hochregulation im Vergleich von Normalgeweben zu niedergradigen Astrozytomen und primären Glioblastomen.

#### Auswahl auffälliger Cluster

Mithilfe des SOM in Abbildung 5.11 konnten Cluster identifiziert werden, die spezielle Expressionsmuster aufwiesen und eine Unterscheidung der Gewebegruppen ermöglichten. Die Abbildung 5.12 zeigt die *Expression-Images* dieser ausgewählten Cluster (*Centroid* und Mittelwert dieser Cluster können in der Abbildung 5.11 abgelesen werden). Die Cluster 1, 5, 6 und 9 waren durch eine *hohe Expression* in Gliomen gekennzeichnet. Zur Unterscheidung der verschiedenen Gewebeentitäten waren besonders die Cluster 1 und 5 geeignet. Während der Cluster 1 niedrige Expressionswerte bei Normalgeweben und niedergradigen Gliomen und hohe Werte bei hochgradigen Gliomen besaß, war der Cluster 5 durch niedrige Werte bei Normalgeweben, mittlere Werte in niedergradigen Gliomen und hohe Expressionswerte in hochgradigen Gliomen gekennzeichnet. Beson-



**Abbildung 5.11:** *SOM mit 16 ( $4 \times 4$ ) Clustern*

Clustern der 201 Ionenkanäle; die Sequenzen für BK-Kanäle sind schwarz dargestellt und beschriftet; die blaue Kurve entspricht dem mittleren Verlauf eines Clusters; die violette Kurve entspricht der SOM-Kurve; die Y-Achse stellt das Intervall  $[-3; 3]$  dar; die X-Achse entspricht den Gewebeprobe: N – Normalgewebe ( $N_{1-3}$ ), A – niedergradiges Astrozytom ( $A_{1-4}$ ) und G – primäres Glioblastom ( $G_{1-5}$ ).

ders auffällig zeigten sich die intrazellulären Chloridkanäle *CLIC1* (Cluster 1) und *CLIC4* (Cluster 5), da sie neben signifikanten, gewebeabhängigen Unterschieden in der Expression zusätzlich sehr hohe Signalwerte aufwiesen. Die Sequenz *KCNMB1* (*38298\_at*) für

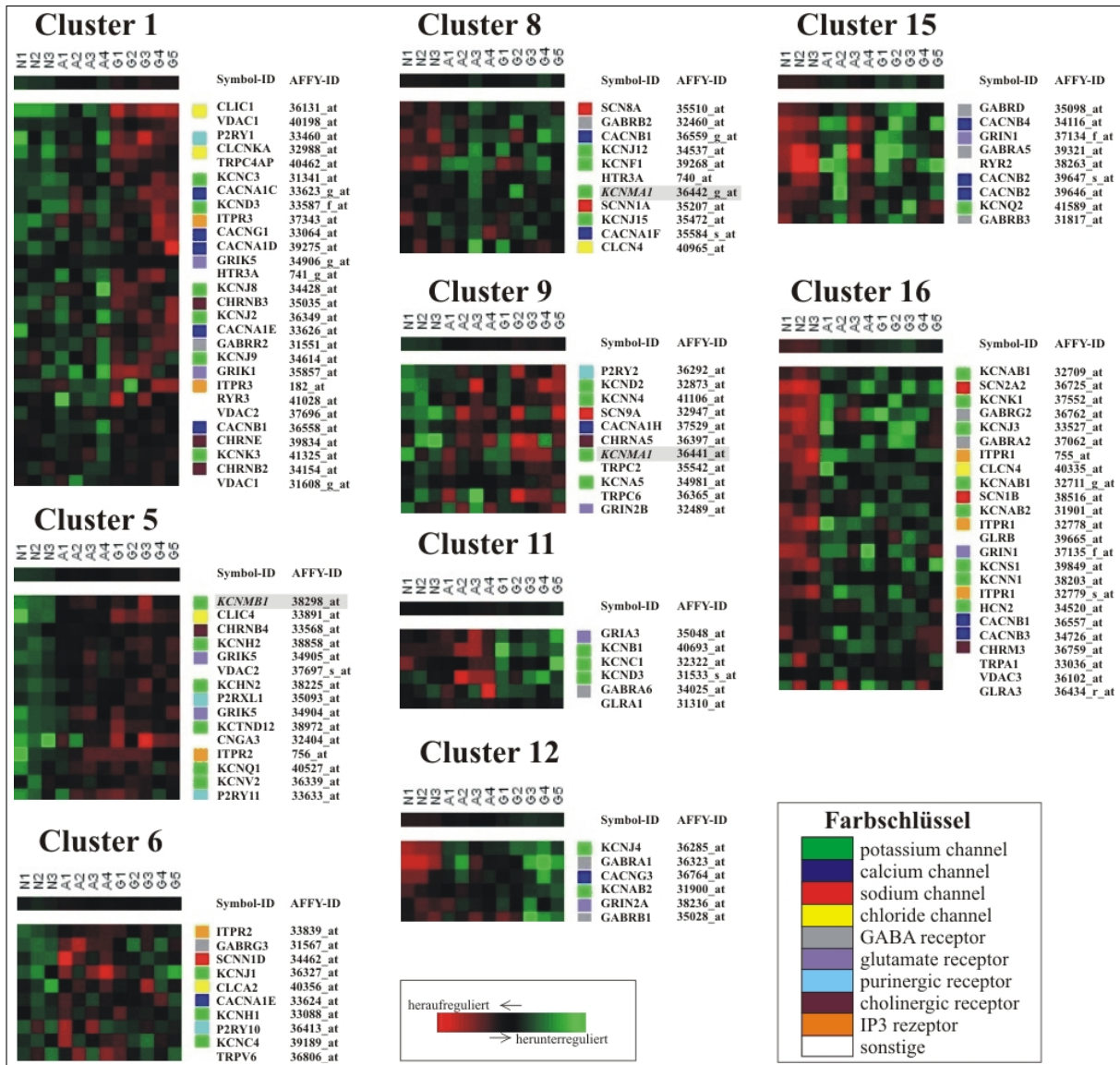


Abbildung 5.12: Auswahl von Clustern des SOM(4 × 4)

Die ausgewählten Cluster sind geeignet, um die unterschiedlichen Gewebegruppen voneinander zu unterscheiden; das farbige Quadrat vor der *Symbol-ID* dient zur Unterscheidung der unterschiedlichen Ionenkanäle mit Hilfe des *Farbschlüssels*; Expression-Image: rot entspricht hoher Expression, grün niedriger Expression; BK-Kanäle sind grau hinterlegt.

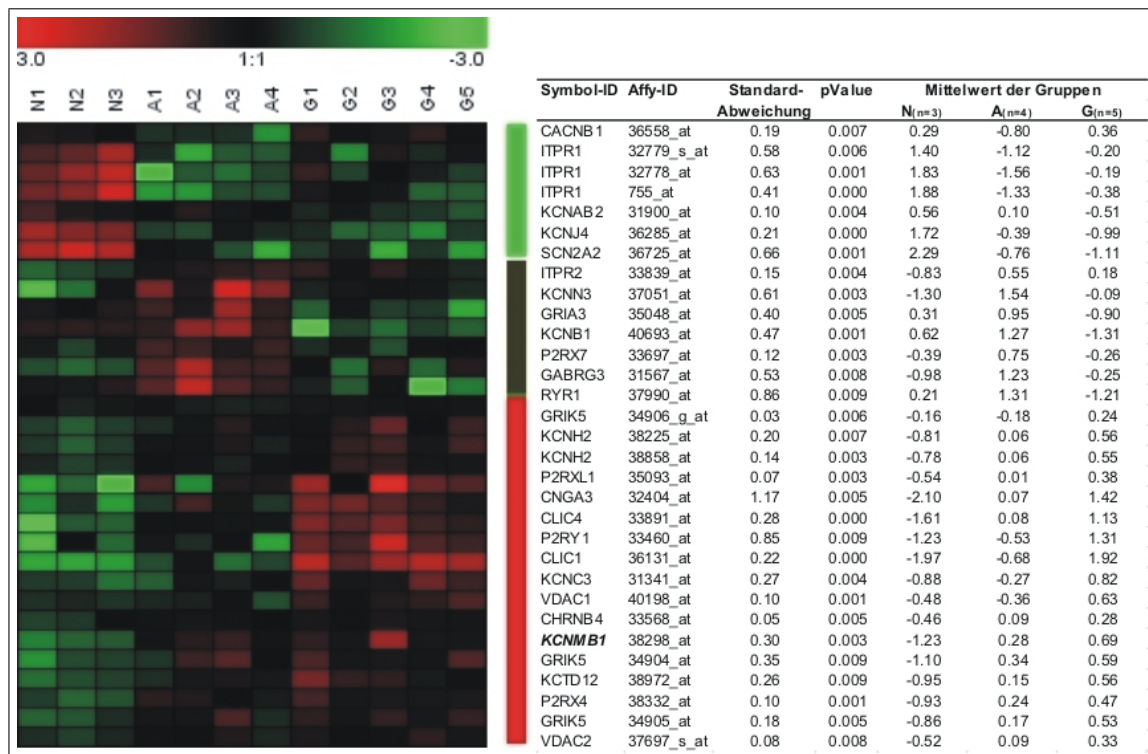
die  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals wurde ebenfalls im Cluster 5 – allerdings ohne auffallend hohe Signalwerte – vorgefunden und zeigte somit eine deutliche Hochregulation in Gliomen. Interessant erschien weiterhin der Cluster 6, da er niedrige Expressionswerte bei Normalgeweben und hochgradigen Gliomen, aber ein hohes Expressionsniveau bei niedergradigen Gliomen aufwies. Die für die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals kodieren-

de Sequenz *36441-at* stellte sich im Cluster 9 dar, welcher durch eine Hochregulation gekennzeichnet ist; allerdings waren erhebliche Schwankungen in der Expression der einzelnen Gewebegruppen nachweisbar: deutlich hochreguliert sind N2, A1, A3, G2, G3, G4; deutlich herunterreguliert sind N1, N3, G1.

Kennzeichnend für die Cluster 8, 11, 12, 15 und 16 waren vergleichsweise hohe Expressionswerte in Normalgeweben. Der auffälligste Vertreter war der Kaliumkanal *KCNJ4* im Cluster 12. Neben seiner verminderten Expression in Gliomen besaß er die höchsten Signalwerte aller ausgewählten Ionenkanäle. In den Cluster 8 fiel die Sequenz *36442-g-at*, welche der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals in den RT-PCR-Untersuchungen entsprach. Ihr Vorkommen in diesem Cluster deckte sich mit der verminderten Expression, welche bereits mittels PCR nachgewiesen wurde. Der Cluster 15 ermöglichte neben einer Unterscheidung von Normalgeweben und Gliomen auch eine Gruppierung innerhalb der niedergradigen Gliome. So zeigten die niedergradigen "Gliompaare" A1 und A2 bzw. A3 und A4 jeweils Ähnlichkeiten in der Expression – dieses Ergebnis wurde bereits in Abbildung 5.8 (Hierarchisches Clustern) deutlich. Die Sequenz *40737-at* für die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals war in den Clustern, die in diesem Abschnitt als *auffällig* bezeichnet wurden, nicht zu finden.

## 5.2.4 ANOVA

Zur Beantwortung der Frage, ob sich die Mittelwerte der Gewebegruppen signifikant unterscheiden und welche Sequenzen hinsichtlich der Gruppierung von Normalgeweben, niedergradigen Astrozytomen und primären Astrozytomen die beste Diskriminierung erlauben, wurde eine ANOVA (*Analysis Of Variance*) der selektierten Gene (201 Ionenkanäle) durchgeführt. Es wurde eine entsprechende Gruppierung (3 Gruppen: Normalgewebe, niedergradige Astrozytome, primäre Glioblastome) vorgenommen und ein *p-Value* von  $p = 0,01$  festgelegt. Die Abbildung 5.13 zeigt das Ergebnis der ANOVA. Nach Abschluss der ANOVA fanden sich 31 Gene, die bei  $p = 0,01$  signifikante Abweichungen der Mittelwerte in den Gruppen zeigten, darunter auch *KCNMB1* (*Affy-ID 38298-at*). Als herausragendes Ergebnis ließ sich beobachten, dass es drei verschiedenen Gruppen von Genen gibt, die die Gruppenbildung der Gewebeproben am Besten beschreiben. In der Abbildung 5.13 wird dieses Resultat durch drei farbige Balken rechts neben dem Expressionsbild gezeigt. Der grüne Balken (1) beschreibt eine Gruppe, die durch eine hohe Expression in Normalgeweben und eine niedrige Expression in Gliomen gekennzeichnet ist. Gene, die eine hohe Expression in niedergradigen Gliomen zeigen, aber in hochgradigen Gliomen und niedergradigen Gliomen eine niedrigere Expression zeigen, werden



**Abbildung 5.13:** ANOVA der normalisierten Werte

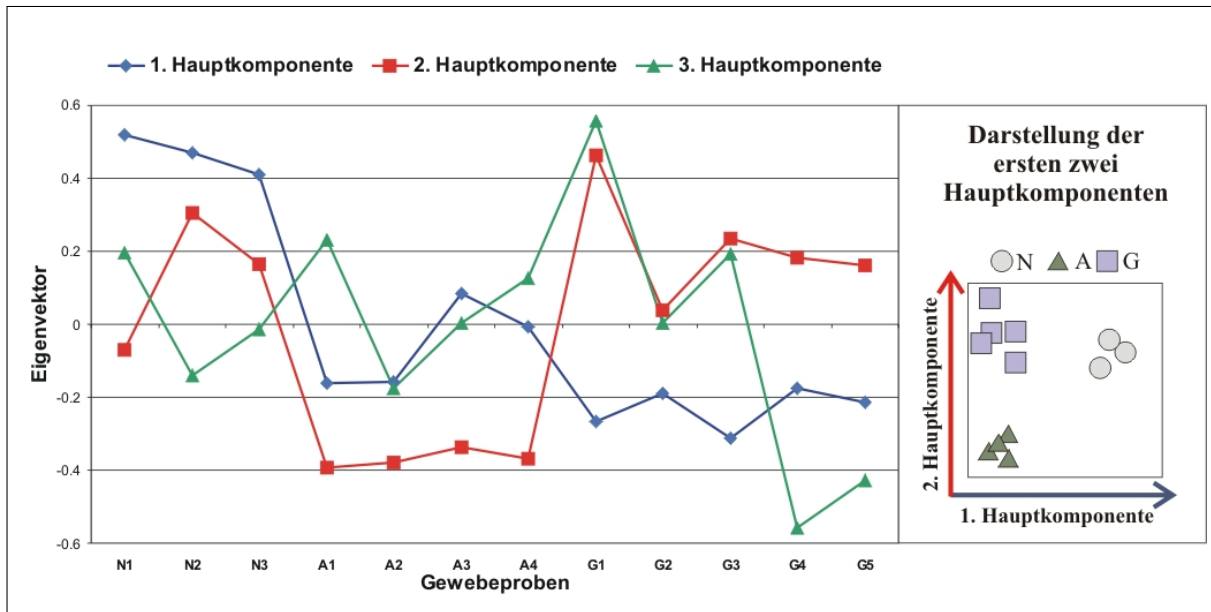
Die Abbildung zeigt die Gene, die für die Gruppierung in Normalgewebe, niedergradige Astrozytome und primäre Glioblastome signifikant ( $p = 0,01$ ) sind; KCNMA1 ist kursiv markiert; die 3 Balken (grün, schwarz, rot) repräsentieren 3 unterschiedliche Gruppen; N – Normalgewebe, A – niedergradige Astrozytome, GB – primäre Glioblastome.

durch den schwarzen Balken (2) dargestellt. Im roten Balken (3) sind die Gene zusammengefasst, welche besonders in hochgradigen Gliomen exprimiert sind. Des Weiteren imponieren drei Gene (der Kaliumkanal *KCNJ4*, die Chloridkanäle *CLIC1* und *CLIC4*) durch außergewöhnlich niedrige  $p$ -Values.

## 5.2.5 PCA

Für die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*) wurden die  $\log_2$ -transformierten Signalwerte der 201 Ionenkanäle benutzt. Ziel dieser Untersuchung war eine Reduzierung der Daten unter Beibehaltung eines Großteils der Varianz, um anschließend höhere Strukturen innerhalb der Daten zu erkennen. Dabei zeigte die PCA, dass die ersten 3 Hauptkomponenten genügen, um 88,03% der Varianzen in den Daten zu erklären. Ausgehend von dieser Beobachtung wurden die ersten 3 Hauptkomponenten (Abbildung 5.14) auf strukturgebende Merkmale untersucht. Die ersten 2 Hauptkompo-





**Abbildung 5.14:** *Hauptkomponentenanalyse mit zweidimensionaler Darstellung*  
 Grafische Darstellung der ersten 3 Hauptkomponenten und zweidimensionale Darstellung der ersten 2 Hauptkomponenten; N – Normalgewebe (N<sub>1–3</sub>), A – niedriggradiges Astrozytom (A<sub>1–4</sub>) und G – primäres Glioblastom (G<sub>1–5</sub>).

nenten erlauben bereits deutliche Rückschlüsse auf Gruppen innerhalb der verschiedenen Gewebe. Die zweidimensionale Darstellung der ersten zwei Hauptkomponenten in Abbildung 5.14 zeigt die vollständig nach Gruppen aufgetrennten Gewebetypen. Die dritte Hauptkomponente kann zur Unterscheidung innerhalb eines Clusters benutzt werden. Sie erklärt die Heterogenität der Gewebegruppen – insbesondere wird die nahe Verwandtschaft der Glioblastome G4 und G5, die sich bereits während des hierarchischen Clusters der Gewebebeispiele zeigte (vergleiche Abbildung 5.8), deutlich.

### 5.3 Zusammenfassender Vergleich RT-PCR – Microarray

Die folgende Tabelle 5.2 fasst die Ergebnisse, die hinsichtlich der BK-Kanäle aus der Untersuchung durch RT-PCR und der Analyse der *Microarray*-Daten gewonnen wurden, zusammen.

Die Ergebnisse der RT-PCR für die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals, die sich auf eine in allen Splicevarianten vorkommende Sequenz bezogen, wurden durch die *Microarray*-Untersuchungen bestätigt (Sequenz 36442-g-at). Zusätzlich ermöglichten die Daten des

<i>BK-Kanal</i>	<i>Methode</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>GB</i>	<i>Bewertung</i>
<b><math>\alpha</math>-Untereinheit</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>0</b>	–	–	<b>herunterreguliert</b>
<b>36442_g_at*</b>	<b>Microarray</b>	<b>0</b>	–	–	<b>herunterreguliert</b>
36441_at	Microarray	0	+	++	hochreguliert
40747_at	Microarray	0	0	0	keine erkennbare Regulierung
<b><math>\beta_1</math>-Untereinheit</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>0</b>	+	++	<b>nur Tendenz möglich**</b>
<b>38298_at</b>	<b>Microarray</b>	<b>0</b>	+	++	<b>hochreguliert</b>
$\beta_2$ -Untereinheit	RT-PCR	0	–	–	herunterreguliert
$\beta_3$ -Untereinheit	RT-PCR	kA	kA	kA	keine Aussage möglich
$\beta_4$ -Untereinheit	RT-PCR	0	–	–	herunterreguliert

**Tabelle 5.2:** Zusammenfassender Überblick der Untersuchungsergebnisse

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Untersuchungen mit RT-PCR und der Analysen der *Microarray*-Daten in Bezug auf Hoch- oder Herunterregulation in der Expression der Untereinheiten des BK-Kanals bei zunehmender Malignität. Dargestellt ist das im Normalgewebe vorgefundene Ausgangsniveau (0) der Expression der jeweiligen Untereinheit und deren Zunahme (+, weitere Zunahme ++) bzw. Abnahme (–, weitere Abnahme ––). \* Diese Sequenz kommt in allen Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit vor, \*\* Einzeldaten zeigen, dass bei Gliomen möglicherweise eine Hochregulation vorliegt; N – Normalgewebe, A – niedergradige Gliome, GB – Glioblastome.

*Microarrays* Aussagen über unterschiedliche Splicevarianten der  $\alpha$ -Untereinheit. Bemerkenswert erschien die Sequenz *36441\_at*, da sie nicht der generellen Herunterregulation der  $\alpha$ -Untereinheit in Gliomen entsprach, sondern eine erhöhte Expression in Gliomen aufwies. Gleichfalls zeigte die  $\beta_1$ -Untereinheit eine Hochregulation in Gliomen, die tendenziell auch in der RT-PCR erkennbar war. Die Splicevariante mit der Sequenz *40747\_at* zeigte keine feststellbare Hoch- bzw. Herunterregulation.

Keine *Microarray*-Daten lagen zu den Untereinheiten  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  und  $\beta_4$  vor; deshalb war kein Vergleich mit den Ergebnissen der RT-PCR möglich.

## 6 Diskussion

Die Expression des BK-Kanals und seiner Untereinheiten im menschlichen Gehirn in Bezug auf Unterschiede zwischen normalem Hirngewebe und Gliomen bzw. Unterschiede zwischen Gliomen verschiedener Malignitätsstufen wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem ersten Schritt durch die etablierte Methode der semiquantitativen RT-PCR untersucht und anschließend durch *Microarray*-Untersuchungen ergänzt. Durch die Verwendung dieser Methoden konnten ausschließlich Aussagen zur mRNA-Expressionsebene des Untersuchungsgewebes gewonnen werden. Inwieweit der BK-Kanal tatsächlich funktionell und strukturell exprimiert ist, bleibt weiterführenden Studien (z.B. *patch-clamp*-Untersuchungen und Fluoreszenzmarkierungen) vorbehalten.

Ein wesentlicher methodischer Schwerpunkt bestand darin, sicherzustellen, dass die RT-PCR in der exponentiellen Phase abläuft. Nur dadurch ist eine ausreichende Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Amplifikation möglich, da sich das Produkt in jedem Schritt verdoppelt. Der Zeitpunkt, zu dem die Reaktionsrate aufhört, sich exponentiell zu verhalten und in eine lineare Phase eintritt, ist extrem variabel (Hayward et al. 1998). Vermutlich ist der Verbrauch der Reaktionskomponenten und der beginnende Zerfall der Produkte dafür verantwortlich. Bei späteren Zyklen sinkt die Amplifikationsrate fast auf 0 (*Plateau*) und es entsteht kaum noch ein Produkt.

Bedeutsam für die semiquantitative RT-PCR war die Äquilibration auf einen Standard. Es ist bekannt, dass viele der etablierten Haushaltsgene (z.B. *GAPDH*) bei Tumoren eine veränderte Expression zeigen (Jesnowski et al. 2002). Unter Einbeziehung der Daten des *Microarrays* konnten wir jedoch sicherstellen, dass das Strukturgen  $\beta$ -Actin, welches wir als Referenz für die RT-PCR gewählt haben, keinen Unterschied in der Expression bei den von uns verwendeten Geweben aufwies.

Die Verwendung des *Microarrays* ermöglichte neben der Validierung der Expressionsdaten der BK-Kanäle die Einordnung der RT-PCR-Ergebnisse in ein breiteres Spektrum von Genen. Es ergab sich somit die Möglichkeit, die Resultate in Beziehung zur Expres-



sion anderer Ionenkanäle zu setzen. Die Vorgehensweise in Form einer Kombination von *Microarray*- und RT-PCR-Untersuchungen kam bereits in anderen Arbeitsgruppen zur Anwendung (Rickman et al. 2001, Qi et al. 2002, van den Boom et al. 2003, Raza et al. 2004).

## 6.1 Expression von BK-Kanälen in normalem Hirngewebe

In dem verwendeten normalen Hirngewebe konnte spezifische mRNA aller Untereinheiten des BK-Kanals nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich in Bezug auf die verschiedenen Untereinheiten in der Expression markante Unterschiede. Da das Normalgewebe dieser Untersuchung während einer Tumoroperation gewonnen wurde und somit zwar nicht unmittelbar, aber doch aus der Umgebung eines Tumors stammt, kann es streng genommen nicht als *normal* klassifiziert werden. Es ist bekannt, dass solche Gewebe, auch wenn sie keine Anzeichen einer Entartung zeigen, reaktive Veränderungen wie beispielsweise eine *Gliose* aufweisen (Dietrich et al. 1998). Durch diese Veränderungen sind Auswirkungen auf die Expression von Kanalproteinen nicht auszuschließen. Da Gliome in der Mehrzahl aus Marklagergewebe entstehen, wäre dieses Gewebe als Referenzmaterial besser geeignet. Aus ethischen Gründen kann gesundes Marklager nur aus einer Autopsie gewonnen werden. Die sofort beginnende hypoxische Gewebsnekrose und Autolyse macht eine Gewebeextraktion direkt nach dem Individualtod des Gewebespenders notwendig. Eine solche Entnahme gestaltet sich jedoch nicht nur aus logistischen Gründen äußerst problematisch. Daher haben wir auf das oben erwähnte, tumorfreie aber nicht reaktiv veränderte Gewebe als Referenzgewebe (der Einfachheit halber als Normalgewebe bezeichnet) zurückgegriffen.

Die  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals konnte – wie bereits in früheren Arbeiten zu diesem Thema beschrieben (Tseng-Crank et al. 1994) – in verschiedenen Hirnarealen nachgewiesen werden und zeigte bei uns ein kräftiges und zuverlässig reproduzierbares Signal. Chang et al. (1997) zeigten ebenfalls das Vorkommen des BK-Kanals in unterschiedlichen Hirnregionen bei der Untersuchung von *(r)slo* in der Ratte. Diese Ergebnisse konnten in nachfolgenden Untersuchungen bestätigt werden (Wanner et al. 1999). Ha et al. (2000) wiesen erhöhte Mengen von *(r)slo* mRNA in verschiedenen Hirnregionen nach, wobei sich die höchste Konzentration in der Habenula befand.

Dass die  $\beta$ -Untereinheit des BK-Kanals im menschlichen Gehirn vorkommt, wenn auch mit unterschiedlicher Expression in den verschiedenen Gehirnregionen (Tseng-Crank

et al. 1996), konnten wir im untersuchten Normalgewebe bestätigen. Vorangegangene Arbeiten zur  $\beta_1$ -Untereinheit zeigten deren Vorkommen in glatten Muskelzellen und die damit verbundenen vasodilatorischen und vasokonstriktorischen Wirkungen (Patterson et al. 2002), nicht aber im Gehirn (Jiang et al. 1999). Unsere Untersuchungen ergaben ebenfalls nur schwache und unregelmäßige Signale, was sich in Verbindung mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (Tseng-Crank et al. 1996, Jiang et al. 1999, Behrens et al. 2000) für eine insgesamt spärliche Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit im menschlichen Gehirn auslegen lässt.

Die Expression der  $\beta_2$ -Untereinheit im menschlichen Gehirn konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zweifelsfrei nachgewiesen werden. Frühere Arbeiten zu diesem Thema konnten die  $\beta_2$ -Untereinheit mit starker Expression in Niere und Pankreas (Uebele et al. 2000) sowie starker Expression im ZNS (besonders Cortex, Hippocampus und Hypophyse) in einer mit der  $\alpha$ -Untereinheit überlappenden Expression nachweisen (Behrens et al. 2000).

Bei der Untersuchung der  $\beta_3$ -Untereinheit konnten bei den PCR-Experimenten, trotz mehrmaliger Wiederholung und hoher Zyklenzahl, keine validen Signale gewonnen werden, d.h., die PCR-Banden waren nicht reproduzierbar. Die Notwendigkeit derartig hoher Zyklen kann mit einer zu geringen mRNA-Ausgangsmenge oder mit unspezifischen Primerbindungen in Verbindung gebracht werden, was wiederum zur Entstehung unspezifischer PCR-Banden beiträgt (Brownie et al. 1997). In Anbetracht der Ergebnisse anderer Studien, bei denen die  $\beta_3$ -Untereinheit beim Menschen hauptsächlich in Plazenta, Hoden, Pankreas und Niere, kaum aber im Gehirn beschrieben wird (Behrens et al. 2000), lässt sich schlussfolgern, dass die  $\beta_3$ -Untereinheit auch in normalem Hirngewebe des Menschen nur in geringem Maße vorkommt.

Die  $\beta_4$ -Untereinheit ist im Gehirn stark exprimiert und zeigt wiederum ein mit der  $\alpha$ -Untereinheit überlappendes Expressionsmuster (Behrens et al. 2000). Das konnte durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Mit der Aussage, dass es sich bei dieser Untereinheit um eine für das ZNS spezifische Form handelt (Weiger et al. 2000), konnten wir uns aufgrund mangelnder nicht-neuronaler Vergleichsgewebe nicht auseinander setzen.

## 6.2 Expression von BK-Kanälen in Gliomen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine deutlich von dem Normalgewebe differenzierbare Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals in Gliomen. Auch zwischen den Gliomentitäten konnte, bezogen auf diese Untereinheit, ein Unterschied in Abhängig-

keit von der Malignität des Tumors festgestellt werden. *Die Höhe der Expression der  $\alpha$ -Untereinheit korrelierte im umgekehrten Maße mit der Höhe der Malignität* – d.h., während die Normalgewebe einen hohen Expressionsgrad zeigten, fanden sich bei den Gliomen vom WHO-Grad II und III mittlere und bei den Gliomen mit WHO-Grad IV niedrige Expressionsgrade. Beide Methoden, RT-PCR und Analyse der *Microarraydaten*, zeigten die negative Korrelation der Malignität des Gewebes zur Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals. Die Untersuchungen der  $\beta_2$ - und der  $\beta_4$ -Untereinheiten des BK-Kanals erbrachten vergleichbare Resultate. Obwohl die Gliome mit WHO-Grad III zu den höhergradigen Gliomen gezählt werden (wie auch WHO-Grad IV), zeigten sie – in Bezug auf die Expression von mRNA der  $\alpha$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_4$ -Untereinheiten der BK-Kanäle – eine engere Verwandtschaft zu den niedergradigen Gliomen (WHO-Grad II).

Die Abnahme in der Expression von Ionenkanälen bei zunehmender Malignisierung in Gliomen konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (Preussat et al. 2003, Patt et al. 2004, Schrey et al. 2002). Bei der Subfamilie  $K_v1.5$  der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle in Gliomen zeigten Preussat et al. (2003) eine entsprechende Korrelation bei der Expression der mRNA und Patt et al. (2004) fanden analog dazu eine abnehmende Expression der Kaliumkanäle *EAG1* und *ERG1* bei zunehmender Malignität. In einer Arbeit zu unterschiedlichen Subtypen spannungsgesteuerter Natriumkanäle ( $Na_v$ ) exprimierten hochgradige Gliome gleichfalls weniger Natriumkanäle als niedergradige Gliome (Schrey et al. 2002). Diese Daten lassen vermuten, dass es in Gliomen generell zu einer ungerichteten Herunterregulation von Ionenkanälen kommt (Schrey et al. 2002, Preussat et al. 2003, Patt et al. 2004), während einige wenige Kanäle, wie beispielsweise die gliomspezifische Isoform des BK-Kanals (gBK) oder die spannungsgesteuerten Chloridkanäle *ClC-2* und *ClC-3*, eine starke Hochregulation erfahren (Liu et al. 2002, Olsen et al. 2003).

Das *Clustern* der auf die Ionenkanäle reduzierten *Microarraydaten* (Abbildung 5.5) ergab, dass sich die drei Gewebeentitäten (N – Normalgewebe, A – niedergradige Gliome, G – höhergradige Gliome) auch weiterhin *signifikant unterschieden*. Alle verwendeten Methoden zum Clustern der Gewebe (HCL, KMC, SOM und PCA) waren geeignet, diese drei Gewebegruppierungen (N, A, G) zu reproduzieren. Folglich enthielt dieser auf Ionenkanäle reduzierte Datensatz noch immer genügend Informationen, um eine Diskriminierung und Differenzierung der Gewebe und ihrer Gruppen zu gewährleisten.

Durch die Methode der RT-PCR konnten keine Daten für die Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit in Normalgeweben und Gliomen gewonnen werden. Allerdings zeigten die Daten des *Microarrays* deutlich, dass *die Höhe der Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit mit der Höhe*

der Malignität des Gliomes korreliert. Die ANOVA (Abbildung 5.13) ergab, dass unter den Genen, die für die Differenzierung von Normalgeweben, niedergradigen und höhergradigen Gliomen verantwortlich sind, die  $\beta_1$ -Untereinheit als einzige Sequenz für BK-Kanäle im Signifikanzniveau von 0,01 lag. Ransom et al. (2002) zeigten, dass BK-Kanäle in Gliomen eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität besitzen. Im Vergleich des gliomspezifischen BK-Kanals (gBK) mit der im gesunden Hirngewebe vorkommenden BK-Kanalisoform *hbr* wurde bei *gBK* eine verlangsamte Aktivierungskinetik festgestellt (Liu et al. 2002). Diese veränderten Kanaleigenschaften lassen sich durch eine mögliche Assoziation des BK-Kanals in Gliomen mit einer zusätzlichen  $\beta$ -Untereinheit erklären. Die Daten des *Microarrays* der vorliegenden Untersuchung lassen vermuten, dass es sich dabei im wesentlichen um die  $\beta_1$ -Untereinheit handelt. Andererseits könnte dieses Ergebnis Ausdruck der verstärkten Vaskularisierung in Gliomen sein, da die  $\beta_1$ -Untereinheit vorzugsweise in glatter Muskulatur von Blutgefäßen zu finden ist (Patterson et al. 2002).

Liu et al. (2002) wiesen mit einem Antikörper gegen BK-Kanäle (*MP-2*) in einem Westernblot eine Zunahme in der Expression des BK-Kanals bei steigender Malignität des Gliomes nach. Ausgehend von einer niedrigen Expressionsstufe bei aus Autopsiematerial gewonnenem Normalgewebe nahm die Expression bei niedergradigen Gliomen (WHO I/II) und bei hochgradigen Gliomen (WHO III/IV) deutlich zu – verwendet wurden 2 Gliome WHO I, 2 Gliome WHO II, 1 Gliom WHO III und 2 Gliome WHO IV. Obwohl über die Spezifität des verwendeten Antikörpers hier keine Aussage gemacht werden kann, ist festzustellen, dass in der beschriebenen Arbeit die Anzahl der einzelnen Gewebe in jeder Tumorgruppe sehr gering ist. Des Weiteren ist anzumerken, dass keine Aussagen über die histologische Bewertung und Auswahl der Proben getroffen wurden. Um etwaige Unstimmigkeiten in den Methoden von Liu et al. (2002) zu bestimmen, entschieden wir uns, mittels RT-PCR an unseren Proben dieses Ergebnis zu überprüfen. Dabei konnten wir die beschriebene gliomspezifische BK-Kanalisoform *nicht* nachweisen. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der Tatsache, dass die von Liu et al. (2002) verwendeten Primersequenzen *nicht-exonübergreifend* waren. Somit könnten DNA-Verunreinigungen als Template gedient und zu falsch-positiven Ergebnissen geführt haben. Bei der Suche in aktuellen Gendatenbanken (<http://genome.ucsc.edu>) konnte die von Liu et al. (2002) beschriebene Sequenz nicht gefunden werden; eventuell handelt es sich bei dem nachgewiesenen PCR-Produkt um eine DNA-Verunreinigung oder ein selbstproduziertes Artefakt.

Die Frage nach dem Vorhandensein von *BK-Kanälen in der humanen Gliomzelllinie 1321N1* konnte bereits durch Basrai et al. (2002) beantwortet werden. Unsere Ergeb-

nisse zeigten anhand der Resultate für die  $\alpha$ -Untereinheit, dass die Expression von BK-Kanälen in die Zelllinie 1321N1 vergleichbar mit der im Normalgewebe ist. Es zeigte sich weiterhin, dass die Untereinheiten  $\beta_2$  und  $\beta_4$  in Bezug auf Normalgewebe einer deutlichen, mit dem Niveau der hochgradigen Gliome vergleichbaren Herunterregulation unterzogen sind. Da der Zelllinie 1321N1 in Form einer Zellsuspension vorlag, der ein fester Gewebeverband fehlte, könnte die verminderte Expression der  $\beta$ -Untereinheiten des BK-Kanals einer verminderten Regulation interzellulärer Prozesse entsprechen.

Die *verwendeten Methoden dieser Arbeit* orientierten sich an etablierten Standards (Liu et al. 2002, Preussat et al. 2003, Patt et al. 2004). Eine vergleichbare Anzahl und Selektion von Geweben lag bisher bei Arbeiten zu diesem Thema (BK-Kanäle in Gliomen) nicht vor. Das Kernstück dieser Arbeit bestand im Vergleich des Expressionslevels von mRNA in Gliomgeweben unterschiedlicher Malignität. Um möglichst einheitliche Gewebegruppen miteinander zu vergleichen war der RT-PCR eine histologische Untersuchung vorangegangen. Insbesondere Gliome sind durch eine ausgeprägte zelluläre und gewebliche Heterogenität gekennzeichnet (Maher et al. 2001). Es ist zu erwarten, dass das Expressionsprofil der mRNA in Gliomen durch viele Faktoren verfälscht wird. In Folge einer verstärkten Vaskularisierung (1) ist der Anteil an glatten Muskelzellen und Endothelzellen erhöht und das Expressionsprofil der mRNA verändert. Des Weiteren bewirken autolytische Prozesse (2), wie sie oft bei Nekrosen in höhergradigen Gliomen vorkommen, eine zusätzlich Degradation der mRNA.

## 6.3 Bedeutung von Ionenkanälen in Gliomen

In Gliomen wurde durch elektrophysiologische Untersuchungen eine große Menge verschiedener Ionenkanäle nachgewiesen: spannungsgesteuerte Kaliumkanäle (Chin et al. 1997), spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Brismar und Collins 1989),  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Kaliumkanäle (Brismar und Collins 1989, Pallotta et al. 1987), spannungsgesteuerte Chloridkanäle (Ullrich et al. 1996) und  $\text{GABA}_A$ -gesteuerte Chloridkanäle (Labrakakis et al. 1998). Ionenkanäle sind beteiligt an der Regulation einer Vielzahl von biologischen Funktionen, über die Kontrolle der Zellerregbarkeit bis hin zur Regulation des Zellvolumens und der Proliferation (Bronstein-Sitton 2003). Der Mechanismus, wie Ionenkanäle an der *Generierung* von Tumoren beteiligt sind, ist bislang nicht aufgeklärt. Es liegen dazu jedoch mehrere Hypothesen vor, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Die Entstehung von Krebszellen im Menschen ist ein aus vielen Einzelschritten bestehender Prozess. Zunächst (1) muss eine neoplastische Zelle in der Lage sein, ohne Be-

schränkungen zu *proliferieren*, die *Apoptose* zu verzögern und eigene *mitogene* Signale zu erzeugen, bzw. *wachstumshemmende* zu ignorieren. In der weiteren Entwicklung muss eine entartete Zelle die *Vaskularisierung* (2) vorantreiben, um die eigene Versorgung zu sichern. Später werden Fähigkeiten (3) zur *Invasion* und *Kolonisation* (Metastasierung) in umgebende Gewebe erforderlich. Diese Eigenschaften einer Tumorzelle konnten in letzter Zeit mit Ionenkanälen in Verbindung gebracht werden (Bronstein-Sitton 2003).

### 6.3.1 Modifizierte $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität

Ein markantes Merkmal bei den in Gliomen exprimierten BK-Kanälen stellt die bereits erwähnte ungewöhnlich hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität dar (Ransom et al. 2002), die mit diversen elektrophysiologischen Charakteristika verbunden ist (Ransom et al. 2003). Bei Gliomen der Zelllinie *STTG1* wurde eine halb-maximale Aktivierung ( $V_{0,5}$ ) von  $-14\text{mV}$  bei einer Konzentration von  $2,1 \times 10^{-6}\text{M}$  freiem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet. Der direkte Vergleich mit einem BK-Kanal des menschlichen Gehirns (*hbr5*) zeigte, dass BK-Kanäle in Gliomen eine größere Sensitivität für  $\text{Ca}^{2+}$  im Bereich von  $7,5 \times 10^{-7}\text{M}$  bis  $3,3 \times 10^{-6}\text{M}$  besitzen (Ransom et al. 2002). Im Unterschied dazu wurden Konzentrationen um  $10^{-5}\text{M}$  freien  $\text{Ca}^{2+}$  benötigt, um in glatten Muskelzellen (Hurley et al. 1999) oder menschlichen Makrophagen (Gallin 1984) negative  $V_{0,5}$ -Werte zu erreichen. In Gliomen konnte mit einer Vielzahl von Neuroliganden (z.B. ATP, Histamin, Bradykinin) eine Triggersung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale beobachtet werden (Weydt et al. 1997).

In Kolonkarzinomepithelzellen stellten Wang et al. (2000) eine signifikante Erhöhung der mRNA von spannungsgesteuerten L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (CACNA1C oder  $C_{av}1.2$ ) fest. Dieser Kanal, zusammen mit mehreren anderen  $\alpha$ -Isoformen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, fand sich bei uns im Cluster 1 der SOM (Abbildung 5.11, S. 70) und zeigte eine deutliche Hochregulation bei den hochgradigen Gliomen, während die meisten  $\beta$ -Isoformen in den Clustern 15 und 16 zu finden waren, was einer Herunterregulation bei den Gliomen entsprach. Die aktuelle Arbeit von Grunnet et al. (2004) beschreibt eine ausgeprägte Co-Lokalisation von BK-Kanälen und den  $\alpha$ -Untereinheiten *1C* und *1D* der spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ. Diese räumliche Nähe beider Kanaltypen hat eine beschleunigte selektive Aktivierung von BK-Kanälen bei lokaler Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Folge. Besondere Bedeutung kommt bei dieser möglichen Interaktion der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals zu. Hagen et al. (2003) wiesen nach, dass für die Kopplung von BK-Kanälen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme die  $\beta_1$ -Untereinheit notwendig ist. Die von uns beobachtete Zunahme von spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und die gleichfalls verstärkte Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals in Gliomen (im *Mi-*

*croarray* nachgewiesen) könnten möglicherweise eine Erklärung für die gesteigerte Aktivität von BK-Kanälen in Gliomen (Ransom und Sontheimer 2001) bieten, ohne mit der gleichzeitig verringerten mRNA-Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals in Widerspruch zu geraten.

### 6.3.2 Zellzyklus und Proliferation

Viele Studien haben bislang Ionenkanäle und ihre Beteiligung an der Regulierung des Zellzyklus und der Zellproliferation untersucht (Sachs et al. 1974, Wonderlin und Strobl 1996, Ransom und Sontheimer 2001, Bringmann et al. 1999). Während fertig differenzierte Zellen (Zellen die nicht proliferieren) eher hyperpolarisiert sind, sind proliferierende Zellen – wie Gliomzellen – weitgehend depolarisiert (Wonderlin und Strobl 1996). Ionenkanäle (besonders spannungsgesteuerte Kaliumkanäle) sind für die Aufrechterhaltung und Veränderungen des Membranpotentials notwendig und somit unmittelbar an der Regulierung des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt (Sachs et al. 1974). Es scheint eine starke Korrelation zwischen dem Membranpotential und der Zellproliferation zu geben; vermutlich ist die Aktivierung von Kaliumkanälen notwendig, um den Ablauf der G1-Phase des Zellzyklus zu ermöglichen (Wonderlin und Strobl 1996). Lang et al. (2000) zeigten, dass Ionenkanäle eine Veränderung im Zellvolumen durch Verschiebung des osmotischen Gradienten bewirken und somit direkt die Zellproliferation steuern.

#### Beeinflussung der Proliferation

Bei der Untersuchung des BK-Kanals in der humanen Zelllinie 1321N1 durch Basrai et al. (2002) wurde die Abhängigkeit der *proliferationsanregenden Wirkungen einer extrazellulären  $K^+$ -Stimulation* des BK-Kanals nachgewiesen. Dabei führte eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums auf Werte von 5-20mM - eine solche Konzentration wird in der nekrotischen Umgebung von Hirntumoren vermutet (Ransom und Sontheimer 2001) - zu einer Erhöhung der Proliferationsrate um 20%. Die Applikation der spezifischen BK-Kanalblocker Iberitoxin (IbTX) oder Tetraethylammonium (TEA) brachte die Proliferation zum Erliegen.

Bringmann et al. (1999) untersuchten Veränderungen in der Aktivität von Kaliumkanälen in normalen und im Rahmen einer proliferativen Erkrankung veränderten Gliazellen. Der Vergleich von retinalen Gliazellen (Müllerzellen) gesunder Vergleichspersonen und Patienten mit einer proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) erbrachte eine deutliche funktionelle Herunterregulation von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen ( $K_{ir}$ )

bei den Geweben der erkrankten Personen. Einerseits zeigte sich eine weniger negative mittlere Membranspannung von  $-52,8\text{mV}$  als bei den gesunden Geweben ( $-80,6\text{mV}$ ), andererseits war die Permeabilität der  $K_{ir}$  mit  $0,3\text{pA/pF}$  im Vergleich zu  $6,0\text{pA/pF}$  deutlich verringert. Es wird vermutet, dass diese offensichtliche Herunterregulation in reaktiven Müller-Gliazellen durch eine verminderte genetische Expression, eine verringerte Einbaurrate in die Zellmembran oder eine funktionelle Inaktivierung bedingt ist – ein deutliches Korrelat dieser verringerten Expression zeigte sich in unseren Daten des *Microarrays* bei *KCNJ4* (vgl. Tabelle 5.1 und Abbildung 5.12, Cluster 12). Vermutlich in Folge dieses weniger negativen Membranpotentials wurde eine 10mal höhere mittlere Öffnungswahrscheinlichkeit des BK-Kanals von  $P_O = 0,30 \pm 0,25$  ( $n = 58$ ) bei proliferativ-aktiven Müller-Glia beobachtet – die Gliazellen der gesunden Retina zeigten  $P_O = 0,03 \pm 0,03$  ( $n = 21$ ). Bei physiologischem Kaliumgradienten war des Weiteren eine erhöhte Amplitude des Einzelkanalstromes (*single channel current*) zu beobachten (Patienten  $-76,7 \pm 15,1\text{mV}$  versus Gesunde  $-48,0 \pm 12,7\text{mV}$ ). Bringmann et al. (1999) vermuten, dass die erhöhte Aktivität von BK-Kanälen die Proliferationsaktivität der Glia-Zellen durch eine *Feedback-Regulation* des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und des Membranpotentials unterstützt. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx könnte zur Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Enzymen (z.B. Proteinkinase C und Calpain) beitragen, die für die Aufrechterhaltung der DNA-Syntheseleistung notwendig sind. Eine weitere Möglichkeit für die proliferationshemmende Wirkung von BK-Kanalblockern ist die Beteiligung der BK-Kanäle an *ras*-Protein-kontrollierten Proliferationswegen, wie sie in Fibroblastenzelllinien beobachtet wurde (Huang und Rane 1994).

Eine weiterführende Arbeit von Kodál et al. (2000) zeigte, dass eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration von  $5,8\text{mM}$  auf  $10\text{mM}$  und auf  $25\text{mM}$  zu einer deutlichen Steigerung der DNA-Syntheserate führt – bewertet wurde diese Syntheserate durch *Bromodeoxyuridine(BrdU)-Labelling*. Während die extrazelluläre Applikation von  $1\text{mM}$  TEA, einem spezifischen BK-Kanalblocker bei unstimulierten Zellen (hier  $[\text{K}_e^+] = 5,8\text{mM}$ ), keine nachweisbaren Effekte auf die DNA-Synthese hatte, zeigte sich bei steigender extrazellulärer Kaliumkonzentration und zunehmender Membrandepolarisation eine zunehmende Hemmung der Syntheserate. In der gleichen Arbeit zeigten Kodál et al. (2000), dass der bekannte proliferationsstimulierende Effekt von EGF (Reichelt et al. 1989) in kultivierten Müllerzellen von BK-Kanalströmen abhängig ist. Die Bindung von EGF an den Rezeptor führt zum Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, was in Verbindung mit der Hyperpolarisierung der Membran die Aktivierung der BK-Kanäle bewirkt – was wiederum den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx verstärkt. Die signifikante Erhöhung der Proli-



ferationsrate durch die extrazelluläre Applikation von 100ng/ml EGF wurde vollständig durch 50nM Iberitoxin oder 1nM TEA aufgehoben (Kodal et al. 2000).

Analog dazu zeigten Moll et al. (2002), dass die durch ATP-Bindung am P2Y-Rezeptor vermittelte Stimulation der DNA-Synthese in Müller-Gliazellen durch spezifische Blockade von BK-Kanälen unterbrochen wird. Gestört wird hierbei ein Kreislauf, der durch die ATP-induzierte Aktivierung der Phospholipase C zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus  $\text{IP}_3$ -gesteuerten, intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern führt und anschließend unter Mithilfe von BK-Kanalströmen den extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx fördert (Moll et al. 2002). Anhand der Expressionsdaten unseres *Microarrays* in der Abbildung 5.12 lässt sich eine deutliche Zunahme der Expression des Rezeptors *P2RY1* in Gliomen beobachten. Diese Sequenz war auch in der Untersuchung signifikanter Gene zur Unterscheidung der Gewebeentitäten (ANOVA) aufgefallen. Auffällig zeigte sich in den Daten des *Microarray* ebenfalls der ATP-gesteuerte, für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{+}$  durchlässige Kanal *P2RX7*. Die Daten der ANOVA (Abbildung 5.13) lassen vermuten, dass dieser Kanal besonders in niedergradigen Gliomen eine Hochexpression erfährt. Eine ähnlich hohe Expression wurde bereits in verschiedenen Formen der B-Zell-Leukämie beobachtet (Adinolfi et al. 2002). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die von Moll et al. (2002) beobachteten Effekte der P2Y-Rezeptor vermittelten Stimulation der DNA-Synthese und ihre Inhibition durch die Blockade von BK-Kanälen, insbesondere durch die Interaktion von *P2RY1* und BK-Kanälen, vermittelt werden. *P2RY1* könnte somit ein wichtiges Stellglied und eine bedeutende Zielgröße der BK-Kanäle sein.

## Beeinflussung der Apoptose

Dieselben Mechanismen, die in Ionenkanälen an der Zellproliferation beteiligt sind, sind auch für die *Apoptose* verantwortlich – so ist Zellschrumpfung eines der ersten Anzeichen des apoptotischen Zelltodes. Insbesondere dem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  kommt bei der Proliferation und Apoptose eine Schlüsselrolle zu. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Verlust von intrazellulärem Kalium die Einleitung der Apoptose begünstigt (Yu et al. 2001).

Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, die die Fragestellung verfolgen, inwieweit die Expression von BK-Kanälen mit der Apoptose zusammenhängen. Eine aktuelle Arbeit von Weaver et al. (2004) beschreibt einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression der *gliomspezifischen Form des BK-Kanals gBK* (Liu et al. 2002) und der Wachstumsrate des Glioms. Die Vermehrung von Gliomzellen auf serumfreiem Medium konnte dosis- und zeitabhängig durch die Applikation des BK-Kanalblockers Iberito-

xin (IbTX) reduziert werden. Erstaunlicherweise konnte dieser Effekt nicht in Medium mit 7% fetalem Kälberserum beobachtet werden. Eine FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) zeigte, dass die IbTX-Behandlung ein Verharren der Gliomzelle in der S-Phase des Zellzyklus bewirkt und in Folge dessen zum Zelltod führt (Weaver et al. 2004). Diese Ausführungen zeigen, dass die weitere Abklärung der Expression von *gBK* – wir haben die Expression in unseren RT-PCR-Experimenten nicht nachweisen können – von entscheidender Bedeutung ist.

### 6.3.3 Migration und Invasion

Eine grundlegende Eigenschaft von humanen Gliomen ist ihre Fähigkeit zur Ausbreitung in umgebendes, gesundes Hirngewebe. Wenn eine Zelle migriert, wird sie entlang ihrer Longitudinalachse – beginnend mit den vorderen Lamellipodien – polarisiert (Lauffenburger und Horwitz 1996). Zu den zellulären Determinanten für diese Migration gehören neben der Fähigkeit zur Adhäsion die Restrukturierung des Actinzytoskeletts und die Sekretion von Enzymen (z.B. Metalloproteasen) in den Interzellularraum (Giese et al. 1994). Die Untersuchung verschiedener Gliomzelllinien zeigte, dass die erhöhte Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine oft mit einer Beschleunigung der Migration verbunden ist. Unterschiedliche Liganden in der unmittelbaren Umgebung können die migrativen Eigenschaften von Gliomen durch ihre Präsenz oder Abwesenheit modifizieren. Die Adhäsion von Gliomzellen an die extrazellulären Matrixproteine Fibronectin, Vitronectin und Kollagen Typ IV wurde als Integrin-abhängig beschrieben. Während die Adhäsion dieser Proteine durch Integrin-Antikörper aufgehoben werden konnte, ließ sich die Adhäsion an Laminin auf diese Weise nicht beeinflussen (Giese et al. 1994).

Die zelluläre Migration und Proliferation sind durch verschiedene gemeinsame *Pathways* verbunden (Gunther et al. 2003). Die wichtigsten Verknüpfungen sind die *Phosphoinositol-Phosphat* regulierenden Enzyme (*PI-3* und *PTEN*), fokale Adhäsions-Kinasen (*FAK*) und verschiedene Tumor-Suppressorgene (*p53*).

#### Beeinflussung der Migration

Fundamentale Bedeutung besitzen die Ionenkanäle bei der Beeinflussung der Migration in Gliomen. Besonders Fluktuationen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen sind an der Regulierung der Migrationsrate neuronaler Zellen beteiligt (Komuro und Rakic 1996).

Eine spezifische Blockade von Chloridkanälen in der Gliomzelllinie *U251MG* durch *Chlo-*

*rotoxin* (*Ctx*), *TEA* und *Tamoxifen* führt zu einer deutlichen und dosisabhängigen Inhibition der gemessenen Migrationsrate (Soroceanu et al. 1999). Diese Blocker verhindern den Fluss von Chloridionen durch die Zellmembran und verhindern die resultierende Zellschrumpfung, welche für eine erfolgreiche Tumorzellinvasion notwendig ist. Auf unserem *Microarray* waren die intrazellulären Chloridkanäle *CLIC1*, *CLIC4* und der transmembranale Chloridkanal *CLCNKA* durch eine deutliche Erhöhung des Expressionsniveaus (vgl. Abbildung 5.12) in der Gruppe der Gliome gekennzeichnet – die Chloridkanäle *CLIC1* und *CLIC4* besaßen zusätzlich sehr starke Signalwerte. Dies lässt vermuten, dass diesen Kanälen eine besondere Rolle in der Regulation des Zellvolumens und somit der Migration zukommt. Auffallend war darüber hinaus, dass sich die erhöhte Expression von *CLIC1* und *CLCNKA* nur in höhergradigen Gliomen zeigte, während die Expression von *CLIC4* in niedergradigen und höhergradigen Gliomen erhöht war. Es ist denkbar, dass bei der Gliomentstehung *CLIC4* schon sehr früh eine Hochregulation erfährt – *CLIC1* und *CLCNKA* hingegen eine gewisse Spezifität in der Expression bei höhergradigen Gliomen besitzen. Ullrich et al. (1996) zeigten in elektrophysiologischen Arbeiten ein funktionelles Pendant zu der von uns beobachteten Hochregulation von Chloridkanälen in Gliomen, indem sie eine deutliche Zunahme von Chloridströmen in menschlichen Gliomen nachwiesen. Eine spezifische Hochregulation der Chloridkanäle *CIC-2* und *CIC-3* in Gliomen, wie von Olsen et al. (2003) beobachtet, konnten wir nicht feststellen.

Soroceanu et al. (1999) zeigten die inhibierende Wirkung der spezifischen BK-Kanalblocker *Iberiotoxin* und *Charybdotoxin* auf die Migration. Als einen beteiligten Mechanismus vermuteten sie, dass der fehlende Chloridstrom eine verminderte Diffusion von freiem Wasser durch die Zellmembran zur Folge hat. Während *Iberiotoxin* in der Zelllinie *U251MG* eine Reduktion der Migrationsrate um  $21,36 \pm 6,5\%$  bewirkte, führte *Charybdotoxin* zu einer schwächeren Reduzierung von  $4,36 \pm 0,23\%$  – dieser Unterschied kann durch die geringere Effektivität von *Charybdotoxin* im Vergleich zu *Iberiotoxin* erklärt werden (Gribkoff et al. 1996).

In Nierenepithelzellen wiesen Schwab et al. (1999) eine Verbindung der Aktivität  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiver Kaliumkanäle, des Aktinzytoskeletts und der Zellmigration nach. Hierbei führte die Blockade durch *Chlorotoxin* zum Abbau von F-Actin, während es in Gegenwart des Stimulators *1-EBIO* zum Wiederaufbau kam. Erstaunlicherweise führte die Blockade und die Stimulation zu einer Behinderung der Migration dieser Zellen.

Die Arbeit von Kraft et al. (2003) zeigte, dass die Applikation der BK-Kanalöffner *Phloretin* und *NS1619* sowie eine unabhängige muskarinerge Stimulation mit *Acetylcholin* eine Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit zur Folge haben. Der genaue Mecha-

nismus dieser offensichtlichen BK-Kanal-abhängigen Hemmung ist noch unverstanden. Der hemmende Effekt der drei Substanzen konnte vollständig durch die Gabe der spezifischen BK-Kanalblocker *Paxilline* und *Iberiotoxin* aufgehoben werden. Eine *muskarinerge* Aktivierung mit einer Inhibition der Zellmigration in Folge einer Oszillation der Membranspannung konnte erstmals durch Bordey et al. (2000) beobachtet werden. Als Folge der antagonistischen Wirkung des Muskarins an einem Azetylcholinrezeptor zeigte sich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freisetzung aus intrazellulären Speichern, die eine indirekte Aktivierung der BK-Kanäle herbeiführte. Dieser Effekt konnte durch Atropin, einem Antagonisten am Azetylcholinrezeptor, vollständig aufgehoben werden.

Im Liquor von Hirntumorpatienten konnte schon früher ein erhöhter Spiegel von Azetylcholin gefunden werden (Bychkovskii et al. 1978), dessen stark mitogene Wirkung auf Gliomzellen bereits durch Guizzetti et al. (1996) beschrieben wurde. Unsere Daten des *Microarrays* zeigten erstmals, dass der muskarinerge Azetylcholinrezeptor *CHRM3* in Glioblastomen deutlich verstärkt exprimiert wird. Bisher war nur bekannt, dass er im peripheren wie auch zentralen Nervensystem weit verbreitet ist (Matsui et al. 1999). Hier zeigt sich deutlich, dass die Hochregulation eines Merkmals in Verbindung mit malignem Wachstum steht.

Daneben wurde von uns die signifikante Hochregulation der nicotinerger Azetylcholinrezeptoren *CHRNA1*, *CHRNA5*, *CHRNA2*, *CHRNA4* und *CHRN4* beobachtet, die in Zusammenhang mit einer Form der *autosomal dominanten, nächtlichen Frontallappen-Epilepsie (ADNFLE)* gebracht worden (Bonati et al. 2002). Verschiedene Ionenkanäle, speziell BK-Kanäle, sind in letzter Zeit in Zusammenhang mit Epilepsie gebracht wurden. Jin et al. (2000) wiesen beispielsweise die konvulsionshemmende Wirkung von BK-Kanalblockern im Gehirn von Mäusen nach. Mehrere Arbeiten an menschlichen Neurozytomen und Gliomen zeigten bei *patch-clamp*-Experimenten überraschend hohe Natriumkanaldichte in neoplastischen Gliazellen (Patt et al. 1996, Ullrich et al. 1996, Labrakakis et al. 1997). Ein Zusammenhang der resultierenden, gesteigerten elektrischen Erregbarkeit von Gliomen mit tumorbedingter Epilepsie ist jedoch nicht bewiesen (Patt et al. 2000).

## **Übergang von Proliferation zu Migration und Invasion**

Die früher geläufige Meinung, dass sich Gliome entweder in einem Zustand der Proliferation oder einem Zustand der Migration und Invasivität befinden (Berens et al. 1990), sich beide Zustände aber ausschließen, konnte durch Corcoran et al. (2003) widerlegt werden. Mithilfe von *time-lapse* Videomikroskopie wurde in ihrer Arbeit die Migration

und Invasion sowie die Mitoserate von Medulloblastomzellen untersucht und mit dem Zellmarker Ki-67 verglichen. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Invasion/Migration und mitotischer Aktivität.

### 6.3.4 Zusammenfassung

BK-Kanäle scheinen in verschiedensten Zellen an Zellproliferation und Migration beteiligt zu sein und diese auf vielfältige Art und Weise zu beeinflussen. Die spezifische Blockade von BK-Kanälen führte zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation (Basrai et al. 2002) und Migration (Kraft et al. 2003). Zusätzlich sind BK-Kanäle in die Signalverarbeitung einer Vielzahl von Effektorsubstanzen – beispielsweise EGF, IGF, ATP und Acetylcholin – eingebunden (Bordey et al. 2000, Kodali et al. 2000, Moll et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben die Expression von mRNA des BK-Kanals in Normalgeweben und Gliomen. An vielen Ionenkanälen, einschließlich der BK-Kanäle, ist eine Herunterregulation in Gliomen bei zunehmender Malignität beobachtet worden (Schrey et al. 2002, Preussat et al. 2003, Patt et al. 2004). Das könnte bedeuten, dass die Ionostase der Gliomzellen weniger regulativen Einflüssen unterliegt und somit auch weniger auf extrazelluläre Regulationsmechanismen reagieren kann (z.B. Apoptosereize). Nach Schwab et al. (1999) beeinträchtigt das Abweichen eines bestimmten Zellparameters vom Optimum spezifische Zellfunktionen. Geringere Schwankungen der Ionostase könnten demzufolge eine verstärkte Proliferationsrate bewirken.

Angeichts der Bedeutung der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals für die Interaktion mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen (Hanner et al. 1998) kommt der von uns im *Microarray* ermittelten Hochregulation von  $\beta_1$  in Gliomen vielleicht eine besondere Geltung zu. Zusammen mit der von uns gezeigten Erhöhung einiger spezifischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (in Gliomen) und der bekannten Co-Lokation und Co-Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und BK-Kanälen (Grunnet und Kaufmann 2004) lässt sich mutmaßen, dass diese Konstellation in Gliomen von entscheidender Bedeutung ist.

## 6.4 Molekulare und funktionelle Gliomdifferenzierung

Mithilfe der Daten des *Microarrays* konnte eine Vielzahl von Unterschieden im Vergleich von Normalgeweben, niedergradigen und hochgradigen Gliomen festgestellt werden. Viele Daten aus den bisherigen molekularbiologischen Untersuchungen von Gliomen – mit herkömmlichen Methoden – haben bereits zu einem *molekularen Muster* von Tumor-

entitäten und Malignitätsgraden geführt (Kleihues et al. 2002). Die Microarray-Daten können dieses Bild erweitern und komplettieren.

#### 6.4.1 Klassifizierung von Gliomen – Auswahl molekularer Marker

Die Identifizierung von speziellen Gensignaturen, die verschiedene Typen und Grade von Tumoren unterscheiden können, ist hervorragend geeignet, um Tumoren zu klassifizieren. Eine Arbeit von Kim et al. (2002) zeigte, dass besonders die Kombinationen von zwei oder drei Genen geeignet sind, um Gliome zu unterscheiden und die Fehlerrate der Klassifizierung signifikant zu senken. Für die Differenzierung zwischen hochgradigen und niedergradigen Gliomen verwendeten Rickman et al. (2001) eine Auswahl von 360 Genen und erhielten eine ausreichende molekulare Signatur, um zwischen pilozytischen Astrozytomen und Glioblastomen zu unterscheiden.

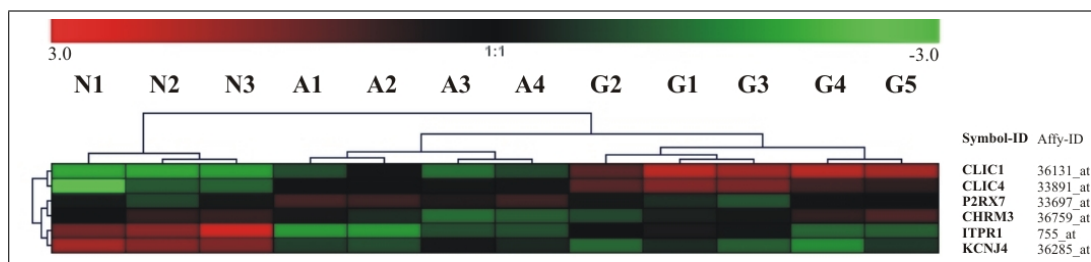
Einen besonders potenten Marker für die Malignität von menschlichen Gliomen präsentierten Tanwar et al. (2002) mit der mRNA-Sequenz des Glykoproteins *YKL-40* (*cartilage glycoprotein-39*). In den verwendeten Geweben zeigte *YKL-40* einen bis zu 60-fachen Anstieg in Glioblastomen gegenüber normalem Hirngewebe. Während beim Western Blot die Sequenz von *YKL-40* in ungefähr 65% aller Glioblastome eine Erhöhung zeigte, fanden sich keine detektierbaren Anzeichen in niedergradigen Gliomen und gesundem Hirngewebe. Es wurde angenommen, dass *YKL-40* an der extrazellulären Matrixdegeneration sowie der Angiogenese beteiligt ist. Anhand unseres Datensatzes konnten wir zeigen, dass sich die mittleren Signalwerte von hochgradigen und niedergradigen Gliomen sogar um Faktor 80 unterschieden, allerdings verwendeten wir einen geringen Probenumfang (ohne Abbildung). Überraschend war zudem das Ergebnis, dass sich Normalgewebe und Glioblastome nur um Faktor 20 unterschieden.

Pomeroy et al. (2002) zeigten anhand mehrerer verschiedener Hirntumoren, wie eine molekulare Unterscheidung durch Methoden der Datenreduktion erfolgen kann und dass sich der klinische Verlauf (*Outcome*) eines speziellen Tumors (hier am Beispiel des Medulloblastoms) mit der Heterogenität des Tumormaterials erklären lässt; es ließen sich Gruppen von Medulloblastomen mit besserem und schlechterem klinischen *Outcome* herausfiltern. Diese Autoren benutzten die Hauptkomponentenanalyse (PCA), hierarchisches Clustern und SOM. Um die Robustheit der ermittelten Marker zu bestätigen, verwendeten sie einen gewichteten Auswahlalgorithmus und verglichen die erhaltene Gruppenstruktur mit 1.000 zufällig entstandenen Permutationen. Dadurch zeigten sie, dass die von ihnen ermittelte Struktur die Daten am besten wiedergibt.

## 6.4.2 Ionenkanäle als molekulare Marker

Die vorliegenden Daten des *Microarrays* gaben Anlass zu der Überlegung, inwieweit Ionenkanäle als *molekulare Marker für die Diskriminierung von Gliomen* geeignet sind. Eine grundlegende Erkenntnis ist, dass das Expressionsprofil der ausgewählten Ionenkanäle des *Microarray* ausreicht, um eine Gruppierung der Gewebeproben zu gewährleisten. Als außerordentlich aufschlussreich erwiesen sich dabei die Daten der PCA. Während die ersten zwei Hauptkomponenten eine zweidimensionale Trennung der Gewebe erlaubten (Abbildung 5.14, S. 74), zeigte die dritte Hauptkomponente mögliche Varianzen innerhalb der einzelnen Gewebegruppen.

Eine mögliche Klassifizierung innerhalb der Gewebegruppen könnte der hierarchischen Struktur der Experimente in Abbildung 5.8 (S. 67) entsprechen. Ausgehend von dieser Topologie versuchten wir eine Gensignatur zu ermitteln, die diese Struktur bei minimaler Anzahl von Genen bedingt. In einem von uns entworfenen Algorithmus zur Auswahl der entsprechenden Gene flossen die Daten der ANOVA, der SOM und der hierarchischen Clusterung ein. Die Arbeitsweise dieses Algorithmus besteht darin, iterativ ein Gen zufällig zu entfernen ohne die hierarchische Gruppierung zu verändern. Die in Abbildung 6.1 dargestellte Gensignatur entspricht dabei einem statistischen Optimum bei 1.000 Durchläufen.



**Abbildung 6.1:** *Diskriminierung mit Gensignatur aus Ionenkanälen*

Die dargestellte Gensignatur entspricht einem statistischen Optimum nach 1.000 Durchläufen. Bei jedem Durchlauf wurden zufällig Gene so entfernt, dass sich die hierarchische Struktur nicht ändert. Konnte kein Gen mehr entfernt werden, ohne dass sich die hierarchische Struktur ändert, wurde der jeweilige Durchlauf abgebrochen.

Um die Robustheit dieser Marker zu testen, wurde die bekannte Gruppierung der Gewebe (Normalgewebe [N<sub>1</sub>..N<sub>3</sub>], niedergradige Gliome [A<sub>1</sub>..A<sub>4</sub>] und höhergradige Gliome [G<sub>1</sub>..G<sub>5</sub>]) mit 1.000 zufällig erzeugten Permutationen verglichen. Die ursprüngliche Gruppierung erwies sich als optimal.

Es ist bemerkenswert, dass jeweils zwei Gene mit einer deutlichen Hochregulation (*CLIC1* und *CLIC4*) bzw. Herunterregulation (*KCNJ4* und *ITPR1*) in Gliomen ausgewählt

wurden. Das Gen *P2RX7* zeigte eine auffallend erhöhte Expression bei niedergradigen Gliomen und differenziert zusätzlich die Gliome G<sub>4</sub> und G<sub>5</sub> von den übrigen Gliomen. Das Expressionsprofil von *CHRM3* besitzt neben einer deutlichen Hochregulation in höhergradigen Gliomen Informationen zur Differenzierung innerhalb der einzelnen Gewebegruppen.

In dieser ermittelten Gensignatur waren keine BK-Kanäle enthalten. Der Algorithmus zur Ermittlung der Signatur war auf eine Minimierung der Genanzahl angelegt. Deshalb wurden nur die Gene, die die vorgegebene hierarchische Struktur am stärksten bestimmen, ausgewählt. Maßgeblich dafür ist, neben einer charakteristischen Expression in den einzelnen Gewebeentitäten, ebenfalls die absolute Stärke der Signalwerte. Obwohl *CLIC4* der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals *KCNMB1* in Abbildung 5.12 (S. 71) im Cluster 5 zusammen vorkommen und somit ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen, taucht nur *CLIC4* wegen seiner hohen Signalwerte in der Gensignatur (Abbildung 6.1) auf. Aus dem gleichen Grund wurde das zuvor beschriebene Gen *P2RY1* (siehe Kapitel 6.3.2) nicht in die Gensignatur aufgenommen; bevorzugt wurde *CLIC1* mit einem ähnlichen Expressionsmuster aber stärkeren Signalwerten.

### **Erhöhte Expression in Gliomen – CLIC1, CLIC4, P2RX7 und CHRM3**

Die Chloridkanäle *CLIC1* und *CLIC4* waren schon zuvor an verschiedenen Stellen dieser Arbeit aufgefallen. So kann ihre Bedeutung für die Diskriminierung der Gewebe kaum überraschen. Die intrazellulären, mit der Mitochondrienmembran assoziierten Chloridkanäle *CLIC1* und *CLIC4* sind bereits in vielen Arbeiten beschrieben worden. *CLIC1* wurde beispielsweise in einer aktuellen Arbeit von Novarino et al. (2004) mit der beim *Morbus Alzheimer* durch  $\beta$ -Amyloid induzierten Neurotoxizität in Mikroglia diskutiert. Fernandez-Salas et al. (2002) beschrieben für *CLIC4* eine Induzierung durch *p53* und *TNF $\beta$* , die insbesondere bei einer DNA-Schädigung zur Einleitung der Apoptose führt. Der ligandengesteuerte Rezeptor *P2XR7* war ebenfalls an einer früheren Stelle dieser Arbeit aufgefallen. Für ihn ist eine Überexpression und die Beteiligung an der Phosphorylierung von extrazellulären Signal-regulierten Kinasen (ERK1/2) in menschlichen Astrozytomen nachgewiesen (Gendron et al. 2003). Die Expression von *P2XR7* auf unserem *Microarray* zeigte eine spezifische Hochregulation in niedergradigen Gliomen. In der Gruppe der höhergradigen Gliome fiel das Expressionsniveau wieder auf die Ausgangsstufe der Normalgewebe. Das lässt vermuten, dass die Expression von *P2XR7* im Zusammenhang mit der *Entstehung niedergradiger Gliome* steht. Für die weitere Entartung zu einem malignen Tumor ist die Funktion von *P2XR7* vielleicht nicht weiter



notwendig – daher wird *P2XR7* in Glioblastomen wieder herunterreguliert. Da maligne Hirntumoren per Definition eine ausgeprägte Infiltration des umgebenden Gewebes zeigen, ist anzunehmen, dass *P2XR7* nur geringe Bedeutung für infiltrative Prozesse besitzt.

Für den muskarinergen Azetylcholinrezeptor *CHRM3* war bislang nur eine starke Verbreitung im peripheren und zentralen Nervensystem bekannt (Matsui et al. 1999). Eine vermehrte Expression in Tumoren ist bisher nicht bekannt und wurde erstmals innerhalb dieser Arbeit aufgezeigt. *CHRM3* scheint im Zusammenhang mit der Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in T-Lymphozyten zu stehen (Kaneda et al. 1993) und in SH-SY5Y Neuroblastomzellen einer gewissen Desensibilisierung zu unterliegen (Willems et al. 2001, Willems et al. 2002).

### **Verminderte Expression in Gliomen – KCNJ4 und ITPR1**

Der einwärtsgerichtete (*inward-rectifier*) Kaliumkanal *KCNJ4* ( $K_{ir}2.3$ ) fiel bereits zuvor durch seine besonders signifikante Expression und durch starke Signalwerte (siehe Tabelle 5.1) auf. Seine verminderte Expression in Gliomen lässt sich vermutlich mit der durch Bringmann et al. (1999) beobachteten Herunterregulation von einwärtsgerichteten Kaliumkanälen in reaktiven Müller-Gliazellen in Zusammenhang bringen. Diese Beobachtung kann möglicherweise auf mehrere Vertreter der einwärtsgerichteten Kaliumkanäle zutreffen. Olsen et al. (2004) bemerkte in elektrophysiologischen Untersuchungen an reifen, differenzierten Astrozyten und an den zwei Gliomzelllinien *D54MG* (WHO Grad IV) und *STTG-1* (WHO Grad III) fehlende  $K_{ir}$ -Ströme in den Gliomen. Er vermutete eine mögliche Verschiebung der Lokalisation (*mislocalization*) der  $K_{ir}$ -Kanalproteine in intrazelluläre Kompartimente –  $K_{ir} 2.3$  und  $4.1$  wurden fast ausschließlich im Zellkern gefunden. Die Herunterregulation von *KCNJ4* in Gliomen könnte einerseits bedeuten, dass die Funktion des Kanals *KCNJ4* in Gliomen einen geringen Einfluss hat. Die ungewöhnlich starke Expressionsminderung (im Vergleich der Signalwerte zu anderen Ionenkanälen) könnte andererseits ein Hinweis darauf sein, dass eine gezielte Ausschaltung von *KCNJ4* in Gliomen erfolgt.

IP3 (Inositol 1,4,5-Trisphosphat) führt zur zyttoplasmatischen Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern. Dieser Prozess spielt auch in Gliomen eine entscheidende Rolle, wie Sabala et al. (1997) in C6 Gliomzellen feststellten. Die Stimulation durch IP von Gliomzellen im Rattenhirn führt durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  zur Aktivierung von Kaliumkanälen, die eine Hyperpolarisation der Zellen bewirken (Reiser et al. 1990). Die von uns beobachtete verminderte Expression des IP3-Rezeptors *ITPR1* in Gliomen

könnte somit den Verlust eines weiteren Regelgliedes zur Kontrolle der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und ebenfalls der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen BK-Kanäle bedeuten.

### **Bedeutung dieser Marker**

Die von uns gefundenen Marker sind geeignet, um funktionell bedeutende Varianzen in der Expression oder der Struktur von Ionenkanälen weiter aufzuklären. Alle diese Markergene zeigen spezifische Qualitäten, um die sie den Datensatz erweitern. Die weiterführende Untersuchung jedes einzelnen Markers auf genetischer und funktioneller Ebene wird vermutlich bemerkenswerte Einblicke in die Entstehung von Gliomen und ihrer spezifischen Eigenschaften liefern. Ihre Beteiligung an wichtigen, für Gliome bedeutenden Signalketten kann hier nur vermutet werden.

## 7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der RT-PCR und des *Microarray* zeigen übereinstimmend eine Herunterregulation des BK-Kanals. Neben der  $\alpha$ -Untereinheit des BK-Kanals waren auch die  $\beta_2$ -Untereinheit und die im Hirn dominante  $\beta_4$ -Untereinheit in Gliomen deprimiert. Dieses Ergebnis passt zu anderen Untersuchungen in Gliomen (Schrey et al. 2002, Preussat et al. 2003, Patt et al. 2004), die ebenfalls eine Depression von Ionenkanälen in Gliomen beobachtet haben. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um ein häufiges Phänomen. Dies könnte eine geringere Beteiligung des BK-Kanals im Sinne von gliomspezifischen Veränderungen bedeuten, als in früheren Arbeiten angenommen wurde (Liu et al. 2002, Ransom et al. 2002, Ransom et al. 2003). Ob diese Veränderungen auch die funktionelle Ebene der BK-Kanalströme betreffen, muss in Folgearbeiten untersucht werden. Für die  $\beta_3$ -Untereinheit des BK-Kanals, die in normalem Hirngewebe kaum gefunden wird, wurde ebenfalls keine Erhöhung in Gliomen festgestellt – was eine Beteiligung an der Entstehung von Gliomen eher unwahrscheinlich macht.

Die auf dem *Microarray* erkennbare Korrelation der Expression der  $\beta_1$ -Untereinheit des BK-Kanals mit der Malignität des Glioms kann auf eine mögliche Verbindung zur tumorassoziierten Zellproliferation, Migration und Invasion hinweisen. Insbesondere die enge Interaktion des BK-Kanals über die  $\beta_1$ -Untereinheit mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen lässt vermuten (Hanner et al. 1998, Grunnet und Kaufmann 2004), dass eine Beeinflussung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Gliomzellen als wesentlicher Mechanismus im Vordergrund steht.

Die Daten des *Microarray* ermöglichten es, bei den unterschiedlichen Malignitätsstufen eine Vielzahl von Ionenkanälen zu untersuchen. In allen Gewebegruppen wurden spezifische Veränderungen im Expressionprofil von Ionenkanälen festgestellt. Insbesondere die Gene für *CLIC1*, *CLIC4*, *P2RX7*, *CHRM3*, *ITPR1* und *KCNJ4* zeigten auffällige Veränderungen. Sie sind als Diskriminierungsmarker geeignet und sollten in späteren Untersuchungen in diesem Bereich berücksichtigt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G, Di Virgilio F, Baricordi OR. 2002. P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*, 99(2):706–8.
- Anderberg MR. 1973. Cluster analysis for applications. Academic Press Inc. New York.
- Atkinson NS, Robertson GA, Ganetzky B. 1991. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila* slo locus. *Science*, 253(5019):551–5.
- Barra V. 2004. Analysis of gene expression data using functional principal components. *Comput Methods Programs Biomed*, 75(1):1–9.
- Basrai D, Kraft R, Bollensdorff C, Liebmann L, Benndorf K, Patt S. 2002. BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport*, 13(4):403–7.
- Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschutz R, Pongs O. 2000. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett*, 474(1):99–106.
- Berens ME, Rutka JT, Rosenblum ML. 1990. Brain tumor epidemiology, growth, and invasion. *Neurosurg Clin N Am*, 1(1):1–18.
- Bonati MT, Combi R, Asselta R, Duga S, Malcovati M, Oldani A, Zucconi M, Ferini-Strambi L, Dalpra L, Tenchini ML. 2002. Exclusion of linkage of nine neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit genes expressed in brain in autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy in four unrelated families. *J Neurol*, 249(8):967–74.

- van den Boom J, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifenberger G, Hanash SM. 2003. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 163(3):1033–43.
- Bordey A, Sontheimer H, Trouslard J. 2000. Muscarinic activation of BK channels induces membrane oscillations in glioma cells and leads to inhibition of cell migration. *J Membr Biol*, 176(1):31–40.
- Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Faude F, Enzmann V, Wiedemann P, Reichelt W, Reichenbach A. 1999. Human Muller glial cells: altered potassium channel activity in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(13):3316–23.
- Brismar T, Collins VP. 1989. Potassium and sodium channels in human malignant glioma cells. *Brain Res*, 480(1-2):259–67.
- Bronstein-Sitton N. 2003. Ion Channels in Cancer. *Alomone Labs Journal Modulator*, 17(1):1–7.
- Brownie J, Shawcross S, Theaker J, Whitcombe D, Ferrie R, Newton C, Little S. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res*, 25(16):3235–41.
- Bychkovskii VN, Pleshtis SA, Sobeshchanskii GV. 1978. Neurohumoral shifts in brain tumor patients. *Zh Vopr Neurokhir Im N N Burdenko*, (6):27–30.
- Chang CP, Dworetzky SI, Wang J, Goldstein ME. 1997. Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res Mol Brain Res*, 45(1):33–40.
- Chin LS, Park CC, Zitnay KM, Sinha M, DiPatri J A J, Perillan P, Simard JM. 1997. 4-Aminopyridine causes apoptosis and blocks an outward rectifier K<sup>+</sup> channel in malignant astrocytoma cell lines. *J Neurosci Res*, 48(2):122–7.
- Corcoran A, Del Maestro RF. 2003. Testing the "Go or Grow" hypothesis in human medulloblastoma cell lines in two and three dimensions. *Neurosurgery*, 53(1):174–84; discussion 184–5.

- DeCoursey TE, Kim SY, Silver MR, Quandt FN. 1996. Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. *J Membr Biol*, 152(2):141–57.
- Dietrich J, Schneider JP, Schulz T, Seifert V, Trantakis C, Kellermann S. 1998. Appearance of the resection area of brain tumors in intraoperative MRI imaging. *Radio- loge*, 38(11):935–42.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25):14863–8.
- Everitt. 1993. Cluster analysis. Edward Arnold Ltd., London UK.
- Fernandez-Salas E, Suh KS, Speransky VV, Bowers WL, Levy JM, Adams T, Pathak KR, Edwards LE, Hayes DD, Cheng C, Steven AC, Weinberg WC, Yuspa SH. 2002. mtCLIC/CLIC4, an organellular chloride channel protein, is increased by DNA damage and participates in the apoptotic response to p53. *Mol Cell Biol*, 22(11):3610–20.
- Ferre F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl*, 2(1):1–9.
- Ferrer J, Wasson J, Salkoff L, Permutt MA. 1996. Cloning of human pancreatic islet large conductance  $\text{Ca}(2+)$ -activated  $\text{K}^+$  channel (hSlo) cDNAs: evidence for high levels of expression in pancreatic islets and identification of a flanking genetic marker. *Diabetologia*, 39(8):891–8.
- Gallin EK. 1984. Calcium- and voltage-activated potassium channels in human macrophages. *Biophys J*, 46(6):821–5.
- Garcia-Calvo M, Knaus HG, McManus OB, Giangiacomo KM, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1994. Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle. *J Biol Chem*, 269(1):676–82.
- Gendron FP, Neary JT, Theiss PM, Sun GY, Gonzalez FA, Weisman GA. 2003. Mechanisms of P2X7 receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation in human astrocytoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(2):C571–81.
- Giese A, Rief MD, Loo MA, Berens ME. 1994. Determinants of human astrocytoma migration. *Cancer Res*, 54(14):3897–904.

- Gribkoff VK, Lum-Ragan JT, Boissard CG, Post-Munson DJ, Meanwell NA, Starrett J J E, Kozlowski ES, Romine JL, Trojnecki JT, McKay MC, Zhong J, Dworetzky SI. 1996. Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol Pharmacol*, 50(1):206–17.
- Grunnet M, Kaufmann WA. 2004. Coassembly of big conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels and L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat brain. *J Biol Chem*, 279(35):36445–53.
- Guizzetti M, Costa P, Peters J, Costa LG. 1996. Acetylcholine as a mitogen: muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur J Pharmacol*, 297(3):265–73.
- Gulbis JM, Zhou M, Mann S, MacKinnon R. 2000. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  channels. *Science*, 289(5476):123–7.
- Gunther W, Skaftnesmo KO, Arnold H, Terzis AJ. 2003. Molecular approaches to brain tumour invasion. *Acta Neurochir (Wien)*, 145(12):1029–36.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, Garcia ML, Grissmer S, Jan LY, Karschin A, Kim D, Kuperschmidt S, Kurachi Y, Lazdunski M, Lesage F, Lester HA, McKinnon D, Nichols CG, O’Kelly I, Robbins J, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti M, Seino S, Stuehmer W, Tamkun MM, Vandenberg CA, Wei A, Wulff H, Wymore RS. 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev*, 55(4):583–6.
- Ha TS, Jeong SY, Cho SW, Jeon H, Roh GS, Choi WS, Park CS. 2000. Functional characteristics of two BKCa channel variants differentially expressed in rat brain tissues. *Eur J Biochem*, 267(3):910–8.
- Hagen BM, Bayguinov O, Sanders KM. 2003. Beta 1-subunits are required for regulation of coupling between  $\text{Ca}^{2+}$  transients and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  (BK) channels by protein kinase C. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285(5):C1270–80.
- Hanner M, Vianna-Jorge R, Kamassah A, Schmalhofer WA, Knaus HG, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1998. The beta subunit of the high conductance calcium-activated potassium channel. Identification of residues involved in charybdotoxin binding. *J Biol Chem*, 273(26):16289–96.

- Hayward AL, Oefner PJ, Sabatini S, Kainer DB, Hinojos CA, Doris PA. 1998. Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 26(11):2511–8.
- Hiddemann W, Huber H, Bartram C. 2004. Die Onkologie - Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie. Springer.
- Hille B. 1986. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *Harvey Lect*, 82:47–69.
- Händel L. 2003. Clusterverfahren zur datenbasierten Generierung interpretierbarer Regeln unter Verwendung lokaler Entscheidungskriterien [Dissertation]. Universität Dortmund.
- Höppner F, Klawonn F. 2000. Obtaining interpretable fuzzy models from fuzzy clustering and fuzzy regression. In *Proc KES00*:162–165.
- Huang Y, Rane SG. 1994. Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem*, 269(49):31183–9.
- Hurley BR, Preiksaitis HG, Sims SM. 1999. Characterization and regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels in human esophageal smooth muscle. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1):G843–52.
- Jain AK, Flynn PJ. 2000. Data clustering: A review. *CM Computing Surveys*.
- Jesnowski R, Backhaus C, Ringel J, Lohr M. 2002. Ribosomal highly basic 23-kDa protein as a reliable standard for gene expression analysis. *Pancreatology*, 2(4):421–4.
- Jiang Z, Wallner M, Meera P, Toro L. 1999. Human and rodent MaxiK channel beta-subunit genes: cloning and characterization. *Genomics*, 55(1):57–67.
- Jin W, Sugaya A, Tsuda T, Ohguchi H, Sugaya E. 2000. Relationship between large conductance calcium-activated potassium channel and bursting activity. *Brain Res*, 860(1-2):21–8.
- Jolliffe IT. 1986. Principal Component Analysis. Springer Series in Statistics.
- Kaneda T, Kitamura Y, Nomura Y. 1993. Presence of m3 subtype muscarinic acetylcholine receptors and receptor-mediated increases in the cytoplasmic concentration of Ca<sup>2+</sup> in Jurkat, a human leukemic helper T lymphocyte line. *Mol Pharmacol*, 43(3):356–64.



- Kim S, Dougherty ER, Shmulevich L, Hess KR, Hamilton SR, Trent JM, Fuller GN, Zhang W. 2002. Identification of combination gene sets for glioma classification. *Mol Cancer Ther*, 1(13):1229–36.
- King B. 1967. Step-wise clustering procedures. *Journal of the American Statistical Association*.
- Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol*, 1(1):44–51.
- Kleihues P, Scheithauer BW, Louis DN, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(3):215–25; discussion 226–9.
- Knaus HG, Eberhart A, Glossmann H, Munujos P, Kaczorowski GJ, Garcia ML. 1994. Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal*, 6(8):861–70.
- Kodal H, Weick M, Moll V, Biedermann B, Reichenbach A, Bringmann A. 2000. Involvement of calcium-activated potassium channels in the regulation of DNA synthesis in cultured Muller glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(13):4262–7.
- Kohonen T. 2001. Self-organizing maps. Dritte Aufl. Springer series in information sciences, 30, Berlin: Springer.
- Komuro H, Rakic P. 1996. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, 17(2):275–85.
- Kraft R, Krause P, Jung S, Basrai D, Liebmann L, Bolz J, Patt S. 2003. BK channel openers inhibit migration of human glioma cells. *Pflugers Arch*, 446(2):248–55.
- Labrakakis C, Patt S, Hartmann J, Kettenmann H. 1998. Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur J Neurosci*, 10(1):231–8.
- Labrakakis C, Patt S, Weydt P, Cervos-Navarro J, Meyer R, Kettenmann H. 1997. Action potential-generating cells in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(3):243–54.
- Lang F, Ritter M, Gamper N, Huber S, Fillon S, Tanneur V, Lepple-Wienhues A, Szabo I, Gulbins E. 2000. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem*, 10(5-6):417–28.

- Lauffenburger DA, Horwitz AF. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3):359–69.
- Li-Smerin Y, Hackos DH, Swartz KJ. 2000. A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K<sup>+</sup> channel. *Neuron*, 25(2):411–23.
- Liu X, Chang Y, Reinhart PH, Sontheimer H. 2002. Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J Neurosci*, 22(5):1840–9.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Caveness WK, DePinho RA. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev*, 15(11):1311–33.
- Matsui M, Araki Y, Karasawa H, Matsubara N, Taketo MM, Seldin MF. 1999. Mapping of five subtype genes for muscarinic acetylcholine receptor to mouse chromosomes. *Genes Genet Syst*, 74(1):15–21.
- McQueen JB. 1967. Some methods of classification and analysis of multivariate observations. 5th Berkeley Symp on Mathematical Statistics and Probability:281–297.
- Merzak A, Pilkington GJ. 1997. Molecular and cellular pathology of intrinsic brain tumours. *Cancer Metastasis Rev*, 16(1-2):155–77.
- Miller C. 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*, 1(4):REVIEWS0004.
- Moczydlowski E. 1998. Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium-channel proteins. *Chem Biol*, 5(11):R291–301.
- Moll V, Weick M, Milenkovic I, Kodal H, Reichenbach A, Bringmann A. 2002. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial DNA synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(3):766–73.
- Murtagh F. 1983. A survey of recent advances in hierarchical clustering algorithms. *The Computer Journal*.
- Novarino G, Fabrizi C, Tonini R, Denti MA, Malchiodi-Albedi F, Lauro GM, Sacchetti B, Paradisi S, Ferroni A, Curmi PM, Breit SN, Mazzanti M. 2004. Involvement of the intracellular ion channel CLIC1 in microglia-mediated beta-amyloid-induced neurotoxicity. *J Neurosci*, 24(23):5322–30.

- Okamoto T, Okabe S. 2000. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution. *Int J Mol Med*, 5(6):657–9.
- Olsen ML, Schade S, Lyons SA, Amaral MD, Sontheimer H. 2003. Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *J Neurosci*, 23(13):5572–82.
- Olsen ML, Sontheimer H. 2004. Mislocalization of Kir channels in malignant glioma. *Glia*, 46(1):63–73.
- Pallotta BS, Hepler JR, Oglesby SA, Harden TK. 1987. A comparison of calcium-activated potassium channel currents in cell-attached and excised patches. *J Gen Physiol*, 89(6):985–97.
- Patt S, Preussat K, Beetz C, Kraft R, Schrey M, Kalff R, Schonherr K, Heinemann SH. 2004. Expression of ether a go-go potassium channels in human gliomas. *Neurosci Lett*, 368(3):249–53.
- Patt S, Schmidt H, Labrakakis C, Weydt P, Fritsch M, Cervos-Navarro J, Kettenmann H. 1996. Human central neurocytoma cells show neuronal physiological properties in vitro. *Acta Neuropathol (Berl)*, 91(2):209–214.
- Patt S, Steenbeck J, Hochstetter A, Kraft R, Huonker R, Haueisen J, Haberland N, Ebmeier K, Hliscs R, Fiebler J, Nowak H, Kalff R. 2000. Source localization and possible causes of interictal epileptic activity in tumor-associated epilepsy. *Neurobiol Dis*, 7(4):260–9.
- Patterson AJ, Henrie-Olson J, Brenner R. 2002. Vasoregulation at the molecular level: a role for the beta1 subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel. *Trends Cardiovasc Med*, 12(2):78–82.
- Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR. 2002. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature*, 415(6870):436–42.
- Preussat K, Beetz C, Schrey M, Kraft R, Wolf S, Kalff R, Patt S. 2003. Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. *Neurosci Lett*, 346(1-2):33–6.

- Qi ZY, Li Y, Ying K, Wu CQ, Tang R, Zhou ZX, Chen ZP, Hui GZ, Xie Y. 2002. Isolation of novel differentially expressed genes related to human glioma using cDNA microarray and characterizations of two novel full-length genes. *J Neurooncol*, 56(3):197–208.
- Ransom CB, Liu X, Sontheimer H. 2002. BK channels in human glioma cells have enhanced calcium sensitivity. *Glia*, 38(4):281–91.
- Ransom CB, Liu X, Sontheimer H. 2003. Current transients associated with BK channels in human glioma cells. *J Membr Biol*, 193(3):201–13.
- Ransom CB, Sontheimer H. 2001. BK channels in human glioma cells. *J Neurophysiol*, 85(2):790–803.
- Raychaudhuri S, Stuart JM, Altman RB. 2000. Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*, 2000:455–66.
- Raza SM, Fuller GN, Rhee CH, Huang S, Hess K, Zhang W, Sawaya R. 2004. Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis. *Clin Cancer Res*, 10(1 Pt 1):212–21.
- Reichelt W, Dettmer D, Bruckner G, Brust P, Eberhardt W, Reichenbach A. 1989. Potassium as a signal for both proliferation and differentiation of rabbit retinal (Muller) glia growing in cell culture. *Cell Signal*, 1(2):187–94.
- Reifenberger G, Collins VP. 2004. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med*, 82(10):656–70.
- Reiser G, Binmoller FJ, Strong PN, Hamprecht B. 1990. Activation of a K<sup>+</sup> conductance by bradykinin and by inositol-1,4,5-trisphosphate in rat glioma cells: involvement of intracellular and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Brain Res*, 506(2):205–14.
- Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, Kuick R, Blaivas M, Kurnit DM, Taylor J, Hanash SM. 2001. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res*, 61(18):6885–91.
- Sabala P, Amler E, Baranska J. 1997. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals induced by ATP and thapsigargin in glioma C6 cells. Calcium pools sensitive to inositol 1,4,5-trisphosphate and thapsigargin. *Neurochem Int*, 31(1):55–64.

- Sachs HG, Stambrook PJ, Ebert JD. 1974. Changes in membrane potential during the cell cycle. *Exp Cell Res*, 83(2):362–6.
- Schlegel U. 1999. Malignant glioma: who benefits from adjuvant chemotherapy? *Ann Neurol*, 45(6):824.
- Schrey M, Codina C, Kraft R, Beetz C, Kalff R, Wolff S, Patt S. 2002. Molecular characterization of voltage-gated sodium channels in human gliomas. *Neuroreport*, 13(18):2493–8.
- Schwab A, Schuricht B, Seeger P, Reinhardt J, Dartsch PC. 1999. Migration of transformed renal epithelial cells is regulated by K<sup>+</sup> channel modulation of actin cytoskeleton and cell volume. *Pflugers Arch*, 438(3):330–7.
- Shepherd GM. 1994. *Neurobiology*. Oxford University Press.
- Silbernagl S, Klinke R. 1996. *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Sneath PH, Sokal RR. 1973. *Numerical taxonomy*. W. H. Freeman.
- Snetkov VA, Hirst SJ, Ward JP. 1996. Ion channels in freshly isolated and cultured human bronchial smooth muscle cells. *Exp Physiol*, 81(5):791–804.
- Soroceanu L, Manning J T J, Sontheimer H. 1999. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl<sup>(-)</sup> and K<sup>(+)</sup> ion channel blockers. *J Neurosci*, 19(14):5942–54.
- Sturn A. 2000. *Cluster Analysis for Large Scale Gene Expression Studies [Diplomarbeit]*. Institute for Biomedical Engineering, Graz University of Technology, Inffeldgasse 18, 8010 Graz, Austria and The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, Maryland 20850, United States of America.
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*, 18(1):207–8.
- Tanaka Y, Meera P, Song M, Knaus HG, Toro L. 1997. Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J Physiol*, 502 ( Pt 3):545–57.
- Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. 2002. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res*, 62(15):4364–8.

- Tolnay M. 2002. Neuropathologie glialer Hirntumoren. *Swiss Medical Forum*, 29/30:686–703.
- Tseng-Crank J, Foster CD, Krause JD, Mertz R, Godinot N, DiChiara TJ, Reinhart PH. 1994. Cloning, expression, and distribution of functionally distinct  $\text{Ca}(2+)$ -activated  $\text{K}^+$  channel isoforms from human brain. *Neuron*, 13(6):1315–30.
- Tseng-Crank J, Godinot N, Johansen TE, Ahring PK, Strobaek D, Mertz R, Foster CD, Olesen SP, Reinhart PH. 1996. Cloning, expression, and distribution of a  $\text{Ca}(2+)$ -activated  $\text{K}^+$  channel beta-subunit from human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17):9200–5.
- Uebele VN, Lagrutta A, Wade T, Figueroa DJ, Liu Y, McKenna E, Austin CP, Bennett PB, Swanson R. 2000. Cloning and functional expression of two families of beta-subunits of the large conductance calcium-activated  $\text{K}^+$  channel. *J Biol Chem*, 275(30):23211–8.
- Ullrich N, Gillespie GY, Sontheimer H. 1996. Human astrocytoma cells express a unique chloride current. *Neuroreport*, 7(5):1020–4.
- Wallner M, Meera P, Toro L. 1996. Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and  $\text{Ca}(2+)$ -sensitive  $\text{K}^+$  channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25):14922–7.
- Wang XT, Nagaba Y, Cross HS, Wrba F, Zhang L, Guggino SE. 2000. The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol*, 157(5):1549–62.
- Wanner SG, Koch RO, Koschak A, Trieb M, Garcia ML, Kaczorowski GJ, Knaus HG. 1999. High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution, and subunit composition. *Biochemistry*, 38(17):5392–400.
- Watanabe K, Tachibana O, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1997. Role of gemistocytes in astrocytoma progression. *Lab Invest*, 76(2):277–84.
- Weaver AK, Liu X, Sontheimer H. 2004. Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J Neurosci Res*, 78(2):224–34.

- Weiger TM, Holmqvist MH, Levitan IB, Clark FT, Sprague S, Huang WJ, Ge P, Wang C, Lawson D, Jurman ME, Glucksmann MA, Silos-Santiago I, DiStefano PS, Curtis R. 2000. A novel nervous system beta subunit that downregulates human large conductance calcium-dependent potassium channels. *J Neurosci*, 20(10):3563–70.
- Weydt P, Moller T, Labrakakis C, Patt S, Kettenmann H. 1997. Neuroligand-triggered calcium signalling in cultured human glioma cells. *Neurosci Lett*, 228(2):91–4.
- Willems JM, Challiss RA, Kelly E, Nahorski SR. 2001. G protein-coupled receptor kinases 3 and 6 use different pathways to desensitize the endogenous M3 muscarinic acetylcholine receptor in human SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*, 60(2):321–30.
- Willems JM, Challiss RA, Nahorski SR. 2002. Endogenous G protein-coupled receptor kinase 6 Regulates M3 muscarinic acetylcholine receptor phosphorylation and desensitization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 277(18):15523–9.
- Wonderlin WF, Strobl JS. 1996. Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol*, 154(2):91–107.
- Yamaguchi F, Morrison RS, Gonatas NK, Takahashi H, Sugisaki Y, Teramoto A. 2003. Identification of MG-160, a FGF binding medial Golgi sialoglycoprotein, in brain tumors: an index of malignancy in astrocytomas. *Int J Oncol*, 22(5):1045–9.
- Yang N, George J A L, Horn R. 1996. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 16(1):113–22.
- Yellen G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902):35–42.
- Yu SP, Canzoniero LM, Choi DW. 2001. Ion homeostasis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 13(4):405–11.

## 9 Anhang

### 9.1 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Patt bedanken, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ohne seine immer wieder aufmunternden Worte hätte ich doch des Öfteren verzweifeln wollen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Beetz, der mich bei meinen Experimenten betreute. Auch an hektischen Labortagen fand er immer Zeit für mich. Er half mir unablässig bei der Lösung der vielen großen und kleinen Probleme, die während einer solchen Arbeit auftreten. Besonders schätzen gelernt habe ich seine Fähigkeit, neue Ideen und Ansätze zu finden und umzusetzen.

Auch mit Herrn Dipl.-Biol. Lutz Liebmann habe ich zusammengearbeitet. Er brachte mir die Grundzüge der *patch-clamp*-Technik bei und war mir ein wertvoller Diskussionspartner.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Deufel, Dr. Dr. Kiehntopf und dem ganzen Team der klinischen Chemie bedanken – insbesondere für die großzügige Bereitstellung der Laborräume und Geräte. Allen verdanke ich viele Anregungen und Tipps. Der immer motivierenden und freundlichen Arbeitsatmosphäre im Team der klinischen Chemie gilt meine Dankbarkeit und Anerkennung.



## 9.2 Lebenslauf

---

*Stefan Brodoehl*

---

07.12.1979	geboren in Mühlhausen (Thüringen)
1985 - 1991	Forstbergschule in Mühlhausen
1991 - 1998	Tilesius Gymnasium in Mühlhausen
Juni 1998	Abitur
10/1998 - 09/1999	Wehrdienst bei der Bundeswehr in Mühlhausen
Oktober 1999	Beginn Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1999 - 2003	Studium der Informatik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Oktober 2001	Physikum
Oktober 2003	Erstes Staatsexamen
Juni 2003	Beginn Dissertationsarbeit am Institut für Pathologie (Neuropathologie Jena, Prof. Stephan Patt)
April 2005	Zweites Staatsexamen

## 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Stephan Patt,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, am 28. Juli 2005

Stefan Brodoehl, Verfasser